

Apoptose in humanen Vena saphena magna Transplantaten in Abhängigkeit von dem Grad der Oxygenierung des Aufbewahrungsmediums M199

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn**

**Olivier Stefan Hejl
aus Paderborn**

2009

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Claus Jürgen Preuße
2. Gutachter: PD Dr. med. Luciano Pizzulli

Tag der Mündlichen Prüfung: 27.10.2009

Aus der Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie der Universitätsklinik Bonn
Direktor: Prof. Dr. med. Armin Welz

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	6
1.	Einleitung	7
1.1	Historische und epidemiologische Aspekte der koronaren Herzkrankheit	7
1.2	Anatomie der V. saphena magna und ihre morphologischen und funktionellen Besonderheiten gegenüber Arterien	11
1.3	Pathogenese der „saphenous vein graft disease“	14
1.3.1	Allgemeine Daten	14
1.3.2	Pathogenese	15
1.3.2.1	Frühzeitiger Verschluss	16
1.3.2.2	Mittelfristiger Verschluss	18
1.3.2.2.1	Proliferation der glatten Muskelzellen in der Media	18
1.3.2.2.2	Migration der VSMC und Expansion der Intima	19
1.3.2.2.3	Die Rolle des Blutflusses und der Scherkräfte in der Pathogenese	20
1.3.2.3	Langfristiger Verschluss – Atherosklerose	21
1.4	Vom Zelltod zur Apoptose	22
1.5	Spezifische Merkmale der Apoptose im Bezug auf Nekrose	23
1.6	Rolle der Apoptose in der „Saphenous Vein Graft Disease“	26
2.	Aufgabenstellung	27
3.	Material und Methoden	28
3.1	Patientenkollektiv	28
3.2	Versuchsaufbau	29
3.3	Herstellung der mikroskopischen Schnitte	31
3.4	Hämatoxylin-Eosin Färbung (H. E. -Färbung)	31
3.5	Durchführung des TUNEL-Testes	31
3.6	Bildgewinnung und Auswertung	33
3.7	Statistische Methoden	33
4.	Ergebnisse	34
4.1	Endothel	34
4.2	Subendothel	36
4.3	Media	38
4.4	Adventitia	41
4.5	Prozentuale Apoptoseraten in Abhängigkeit von der Zellschicht und der Ischämiezeit	43

5.	Diskussion	44
6.	Zusammenfassung	49
7.	Literaturverzeichnis	51
8.	Danksagung	62

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
ACVB	Aorto-Coronarer-Venen-Bypass
AP	Angina Pectoris
aP	alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
bFGB	Basic Fibroblast Growth Factor
EDRF	Endothel Derived Relaxing Faktor
FCS	Fetal Calfserum
HUVECS	Humane umbilicale venöse Endothelzellen
IGF-1	Insulin-like Growth Faktor
KHK	Koronare Herzkrankheit
NSMC	Non Smooth Muscle Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	Plated-Derived Growth Factor
PGI ₂	Prostaglandin-2
PK	Proteinase K
ROI	Region of Interest
SMC	Smooth Muscle Cells
SVGD	Saphenous Vein Graft Disease
t-PA	Tissue Plasminogen Aktivator
TUNEL	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Mediated dUTP Nick End Labeling
V	Vena
VSMC	Vascular Smooth Muscle Cells

1. Einleitung

1.1 Historische und epidemiologische Aspekte der koronaren Herzkrankheit

"Es gibt einen Brustschmerz, der wegen seiner nicht alltäglichen Beschaffenheit eine besondere Beschreibung verdient. Die Brust wird davon so beengt, dass er nicht mit Unrecht Angina Pectoris genannt werden könnte. Die von dieser Krankheit Ergriffenen pflegen während des Gehens, besonders nach Besteigen einer Anhöhe oder gleich nach dem Essen von einer höchst unangenehmen Brustbeklemmung befallen zu werden, die den nahen Tod droht, wenn sie sich vermehren oder lange dauern würde. Sobald der Kranke stillsteht, vergeht die Beklemmung in demselben Augenblick gänzlich. Der Schmerz zieht sehr oft von der Brust nach dem linken Ellenbogen. Männer, die über 50 Jahre alt sind, werden vorzüglich von dieser Krankheit ergriffen." (Heberden, 1772)

Mit diesen Worten beschrieb und prägte William Heberden in seinen Vorträgen über dieses Krankheitsbild vor dem „Royal College of Physicians“ in London im Jahre 1786 den Begriff Angina Pectoris. Obwohl dieser Vortrag vor über 200 Jahre gehalten worden ist, hat diese typische Beschreibung der Klinik eines Angina Pectoris Anfalls, als Ausdruck einer koronaren Herzerkrankung, ihre Gültigkeit behalten. Lange Zeit gab es in der Medizin keinen therapeutischen Ansatz zur Behandlung der koronaren Herzerkrankung. Die ersten Behandlungsversuche waren generell inadäquat und einige wirken aus unserer heutigen Sicht eher bizarr (Mueller et al., 1997). In einer Zeit, in der weder die anatomischen, physiologischen, noch die pathophysiologischen Zusammenhänge zwischen der Herzdurchblutung und der koronaren Herzerkrankung bekannt waren, lag der Schwerpunkt der ärztlichen Behandlung in einer palliativen Therapie. Der Therapieerfolg wurde anhand der Linderung der Angina Pectoris Symptome gemessen.

Ein wichtiger Schritt zur Erstellung neuer Therapiekonzepte war die Entdeckung von feinen Gefäßverbindungen des Herzens mit dem Perikard, Diaphragma und den Bronchien durch Langer am Ende des 19. Jahrhunderts (Langer, 1880). Zu dieser Zeit wurden drei grundsätzlich verschiedene Therapieansätze zur Linderung der Angina Pectoris diskutiert:

1. Die sympathische Gangliolyse (Francois-Franck, 1899)
2. Verstärkung der myokardialen Durchblutung (Pratt, 1898)
3. Die Thyroidektomie (Kocher, 1902)

Jede dieser verschiedenen Strategien fand ihre Verfechter. So publizierte zum Beispiel Blumgart 1933 einen Artikel über den therapeutischen Effekt der totalen Ablation der gesunden Schilddrüse bei obstruktivem Herzversagen und Angina Pectoris (Blumgart, 1933).

Die Sympathikolyse wurde erstmals von Jonnesco in den 20er Jahren durchgeführt (Jonnesco, 1920). Diese Art der Therapie wurde vor allem in den 40er und 50er Jahren propagiert, wobei eine Mortalitätsrate von 7% in Kauf genommen wurde (Lindgren, 1950).

Es ist bemerkenswert, dass der Therapieansatz, der sich zu einem sehr viel späteren Zeitpunkt durchsetzen sollte, zunächst nicht weiter verfolgt wurde. Der in Amerika arbeitenden Franzose Alexis Carrel war der Erste, der im Tierexperiment arterielle Bypässe zu Koronararterien herstellte und Venenstücke als Interponate in den arteriellen Kreislauf verpflanzte (Carrel, 1910). Hierfür erhielt er 1912 den Nobelpreis „in Anerkennung seiner Arbeit über die Gefäßnaht und die Transplantation von Blutgefäßen und Organen“. Um die Funktionsfähigkeit seiner Gefäßnähte zu beweisen transplantierte er ein Hundeherz an die Halsgefäße eines anderen Tieres, das zwei Stunden lang schlug. Mit seinen großen Fortschritten im Bereich von chirurgischen Nahttechniken und der Gefäßtransplantation gehört er zu den Begründern der modernen Gefäßchirurgie. Leider wurde zu diesem Zeitpunkt die klinische Relevanz seiner Arbeiten für die Therapie der koronaren Herzkrankheit nicht erkannt und nicht weitergeführt. Der Schwerpunkt der Forschung lag zu dieser Zeit in der so genannten indirekten Revaskularisation. Dieser Therapieansatz basierte auf der Beobachtung, dass es bei entzündlich verändertem Perikard zu einer vermehrten Kapillargefäßneubildung kommt (Moritz et al., 1932). Es wurde versucht, durch Provokation einer Perikarditis eine Angiogenese zu bewirken. Man erhoffte sich eine Verstärkung der myokardialen Durchblutung durch eine vermutete Kommunikation der neu gebildeten Gefäße mit den Koronargefäßen. Erstmals wurde dieses Vorgehen durch Beck 1935 als Cardiopericardiopexy beschrieben (Beck, 1935). Im Laufe der Jahre wurden

verschiedene Methoden entwickelt, um eine Perikarditis zu provozieren. Es wurde je nach Verfahren Knochenmehl, Sand, Talk, Phenol, Silber-Nitrat oder Asbest appliziert (Beck, 1935; Harken et al., 1955; Kline et al., 1956). Durch chirurgische Anlagerung von stark vaskularisiertem Gewebe an das Perikard hoffte man, eine Anastomisierung hervorzurufen. Je nach Gewebeart wurden diese Techniken in Anlehnung an Beck als Cardiopneumopexie, Cardiojejunopexie, Cardiogastropexie oder als Cardiolienopexie bezeichnet.

Ein weiterer stark beachteter Therapieansatz war das Ligieren verschiedenster Gefäße. Ziel dieses Ansatzes war es, durch die nun veränderte Hämodynamik und entstehende Umgehungskreisläufe eine bessere Durchblutung des Myokards zu bewirken.

Im weiteren Verlauf, nach zahlreichen medizinischen und technischen Fortschritten wie z.B. der Verbesserung der Herz-Lungen Maschine, der Entwicklung von Blutkonserven und besserem Nahtmaterial, war es Gordon Murray, der Pionier der Heparin-Therapie, der den gefäßchirurgischen Therapieansatz wieder aufnahm. Es gelang ihm nach langen Versuchsreihen ein Venenteilstück in den koronararteriellen Kreislauf zwischenzuschalten.

Der nächste wichtige Schritt in der Entwicklung der modernen Kardiochirurgie war die direkte Implantation der Arteria mammaria in das Myokard durch Vineberg (Vineberg, 1946). Diese als „Vineberg Operation“ berühmt gewordene Operationstechnik wurde 1950 erstmals beim Menschen durchgeführt. Diese Therapie führte häufig zu einer Besserung der anginösen Beschwerden und wurde bis in die frühen 70er Jahre durchgeführt.

Durch wachsende Erfahrung und stetig verbesserte Technik wurden immer mehr Herzoperationen am Menschen durchgeführt. Am 2. Mai 1961 gelang es als Erstem Robert Goetz die A. mammaria als Bypass erfolgreich auf die Koronararterien beim Menschen zu Verpflanzen (Goetz et al., 1961). Besonders bemerkenswert an dieser Pioniertat ist, dass die Verbindung der Gefäße mit Hilfe von Tantal-Ringen, an Stelle einer konventionellen Gefäßnaht realisiert wurde. Nicht einmal ein Jahr später wurde von der ersten V. saphena magna Bypass-Operation durch David Sabiston Jr. berichtet. Leider starb der Patient 3 Tage später durch einen thrombembolischen Verschluss des Bypasses, wie die Autopsie ergab.

Die erste erfolgreiche aortokoronare Venenbypass Operation (ACVB) unter Verwendung der V. saphena magna gelang dem Chirurgenteam Garrett, Dennis und DeBakey am Methodist Hospital Houston am 23 November 1964. Noch sieben Jahre später konnte die Durchgängigkeit des venösen Transplantats angiographisch nachgewiesen werden (Garrett et al., 1973).

Von diesen ersten chirurgischen Pioniertaten zu dem heutigen Routineverfahren war es noch ein langer Weg. Diese Entwicklungsarbeit ist dem Argentinier Rene Favaloro zu verdanken. Er war der erste, der 1967 die Benutzung der V. saphena magna als Standard in der aortokoronaren Bypasschirurgie etablierte. Von seiner Arbeitsstätte, der Cleveland Clinic, erfolgte die weltweite Verbreitung dieser Operationstechnik. Favaloro entwickelte für die Bypasschirurgie verschiedene Operations- und Nahttechniken, die auch heute noch zum operativen Standard gehören (Favaloro, 1969). Er gestaltete maßgeblich die Kardiochirurgie und wird daher aufgrund seiner Verdienste häufig als Vater der modernen Bypasschirurgie bezeichnet.

Wenn man sich in Deutschland den Zeitraum von 1979 bis heute betrachtet, so muss man feststellen, dass die Anzahl der Koronaroperationen von anfänglichen 3 612 Operationen nahezu um das 20fache zugenommen hat. Heutzutage gehört die operative Koronarrevaskularisation zu den Standardeingriffen. So wurden in Deutschland allein im Jahr 2002 an den verschiedenen Herzzentren 70 185 koronare Herzoperationen durchgeführt. Dies entspricht 72,96 Prozent aller in diesem Jahr durchgeführten Herzoperationen (Bruckenberg, 2003).

In Deutschland war die häufigste Diagnose bei vollstationären männlichen Patienten im Jahre 2002 die chronische ischämische Herzkrankheit (365 902 Fälle). Bei den Frauen lag hinter den Diagnosen „Spontangeburt“ und „bösartige Neubildungen der Brustdrüse“ die „ischämische Herzkrankheit“ an der dritten Stelle der zehn am häufigsten gestellten Diagnosen mit 179 309 Fällen.

In der Statistik der am häufigsten diagnostizierte Todesursache belegen die Diagnosen „Chronische ischämische Herzkrankheit“ u. „akuter Myokardinfarkt“ mit deutlichem Abstand die beiden ersten Ränge. (Statistisches Bundesamt 2006).

Tabelle 1: Sterbefälle nach den 10 häufigsten Todesursachen 2006
(nach Statistisches Bundesamt)

Todesursachen 2006	Rang	Anzahl
Chronische ischämische Herzkrankheit	1	77.845
Akuter Myokardinfarkt	2	59.938
Herzinsuffizienz	3	47.079
Bösartige Neubildung der Bronchien und der Lunge	4	40.744
Schlaganfall, nicht als Blutung oder Infarkt bezeichnet	5	28.566
Sonstige chronische obstruktive Lungenkrankheit	6	20.709
Pneumonie, Erreger nicht näher bezeichnet	7	19.713
Bösartige Neubildung des Dickdarmes	8	18.475
Hypertensive Herzkrankheit	9	17.619
Bösartige Neubildung der Brustdrüse	10	17.553

1.2 Anatomie der V. saphena magna und ihre morphologischen und funktionellen Besonderheiten gegenüber Arterien

Die V. saphena magna unterscheidet sich sowohl anatomisch als auch physiologisch von den Arterien. Die Wand der Vene wird traditionell in drei verschiedene Schichten unterteilt: Intima, Media und Adventitia.

Die Intima besteht aus dem Endothel, einem geschlossenen, einschichtigen Verband flacher Zellen, die in der Regel auf einer Basalmembran ruhen und aus dem

subendothelialen Bindegewebe, das aus zarten Kollagenfasern und feinen elastischen Fasern besteht. Die Intima kontrolliert den Stoff- und Gasaustausch zwischen Blut und Gefäßwand.

Die Media enthält flache, schraubenförmig verlaufende Züge glatter Muskelzellen und elastischer Netze. Typisch ist die Auflockerung der Muskelzellverbände durch kollagenes Bindegewebe. Eine scharf abgrenzbare Media-Adventitiagrenze, wie sie in Arterien vorliegt, fehlt.

Die Adventitia besteht neben Geflechten aus Kollagenfasern vornehmlich aus längsgerichteten, elastischen Fasern und Muskelbündeln (Schiebler 1997: S.156-159).

Der Aufbau von Arterien im Vergleich zu Venen erscheint auf den ersten Blick sehr ähnlich. Bei genauerer Betrachtung jedoch gibt es relevante anatomische und physiologische Unterschiede. So unterscheidet man bei den Arterien zwei Arten, die nach ihrer vorherrschenden Gewebeart in der Media als Arterien vom elastischen oder muskulären Typ bezeichnet werden. Trotz ihres unterschiedlichen Aufbaues sind beide jedoch an die hohen Blutdrücke, die im arteriellen Schenkel des Gefäßsystems vorherrschen, perfekt adaptiert.

Venen sind von ihrer Vasomotorik nicht für hohe Blutdrücke konzipiert. Im Bereich venöser Blutdrücke haben sie eine sehr hohe Elastizität, sind jedoch im Bereich arterieller Drücke nur wenig dehnbar (Wesly et al., 1975). Das von den Arterien abweichende Kontraktions- und Relaxationsverhalten von Venen lässt sich durch verschiedene Fakten erklären. Eine herausragende Rolle spielt hierbei das Endothel. Es konnte experimentell bewiesen werden, dass das Endothel sowohl exzitatorische als auch inhibitorische Wirkung auf die glatte Muskulatur der Vene hat. Interessanterweise konnte in den gleichen Versuchsreihen festgestellt werden, dass der inhibitorische Effekt des Endothels auf die Gefäßmuskulatur bei den Arterien überwiegt und der exzitatorische Effekt bei den Venen am größten ist. Dieses bedeutet, dass eine Stimulation des Endothels bei Arterien eher zu einer Relaxation und bei Venen zu einer Kontraktion führt (De Mey und Vanhoutte, 1982; Vanhoutte, 1987).

Der Unterschied der verschiedenen Gefäße zeigt sich auch in ihrem biochemischen Verhalten. Venen haben eine hohe Aktivität des Enzyms Laktatdehydrogenase, jedoch eine dafür im Verhältnis geringe Aktivität anderer oxidativer Enzyme (McCabe et al., 1967). Es konnte nachgewiesen werden, dass der Lipidstoffwechsel von Bypass Venen

proatherogen ist. Die V. saphena magna hat eine langsamere Lipolyse, eine vermehrte Lipidsynthese und eine stärkere Lipidaufnahme als Koronararterien (Shafi et al., 1987).

Die Unterschiede zwischen Venen und Arterien sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Anatomische und physiologische Unterschiede zwischen Venen und Arterien (nach Cox et al., 1991)

Anatomie	Vene	Arterie
Endothelzellen	breiter, dünner, weniger fest mit Subendothel verbunden	kleiner, dicker, fester mit Subendothel verbunden
Intima	mehr Permeabel	weniger Permeabel
Membrana Elastica Interna	kaum ausgeprägt	stark ausgeprägt
Media	Dünn	dick
Elastische Membranen	nicht vorhanden	vorhanden
Glatte Muskelzellen der Media	wenige, zirkulär u. longitudinal angeordnet, weit durch Kollagenfasern verstreut	zirkulär angeordnet, gleichmäßig, von Kollagen u. elastischen Fasern und Matrix umgeben
Vasa Vasorum	viele Anastomosen	wenig Anastomosen
Klappen	Vorhanden	nicht vorhanden
Physiologie		
Elastizität	relativ unelastisch bei arteriellem Druck	elastisch bei arteriellem Druck
Rolle des Kollagen	Gering	hoch
Lipolyse	Langsam	schneller
Lipidsynthese	hohe aktive Produktion	geringe aktive Produktion
PGI ₂ -Produktion	Gering	mehr
Endothel	stimuliert die Kontraktion der glatten Muskelzellen	hemmt die Kontraktion der glatten Muskelzellen
Sensibilität auf Vasokonstriktoren	stark sensibel	wenig sensibel
Sensibilität auf Vasodilatoren	wenig sensibel	stark sensibel

1.3 Pathogenese der „saphenous vein graft disease“

1.3.1 Allgemeine Daten

Anhand der Langzeitergebnisse der kardialen Bypasschirurgie musste festgestellt werden, dass der venöse Bypass zu den Herzkranzgefäßen keine kurative Therapie darstellt, sondern nur palliativer Natur ist.

Es wird angenommen, dass innerhalb des ersten Jahres nach der Operation zwischen 10 und 15% der Venentransplantate verschlossen sind. Die jährliche Neuverschlussrate wird auf 1-2% innerhalb der ersten sechs postoperativen Jahre geschätzt. In dem Zeitraum von sechs bis zehn Jahren nach einem Bypass geht man sogar von einer jährlichen Neuverschlussrate von 4% aus. Hieraus folgt, dass nach einem postoperativen Zeitraum von 10 Jahren nur noch 60% der venösen Bypässe offen sind, wobei jedoch von diesen auch nur 50% keine signifikanten Stenosen aufweisen (Bourassa et al., 1991; Campeau et al., 1984; Fitzgibbon et al., 1996). Des weiteren muß beachtet werden, dass die Grunderkrankung des Patienten, die native KHK, weiterhin mit durchschnittlich 5% pro Jahr zunimmt (Alderman et al., 1993).

Bei Betrachtung dieser beiden Krankheitsprozesse verwundert es nicht, dass die Anzahl der Angina Pectoris Anfälle, als Ausdruck koronarer Insuffizienz, höher liegt als die effektiven Venenverschlussraten. So treten erneute AP Anfälle bei 24% der operierten Patienten innerhalb des ersten Jahres auf. Innerhalb der ersten sechs Jahre gilt dies sogar für 40% der Patienten (Cameron et al., 1995). Bei 10-15% der Patienten mußte zehn Jahre nach einer aortokoronaren Bypass Operation ein neuer Bypass angelegt werden (Van Brussel et al., 1997).

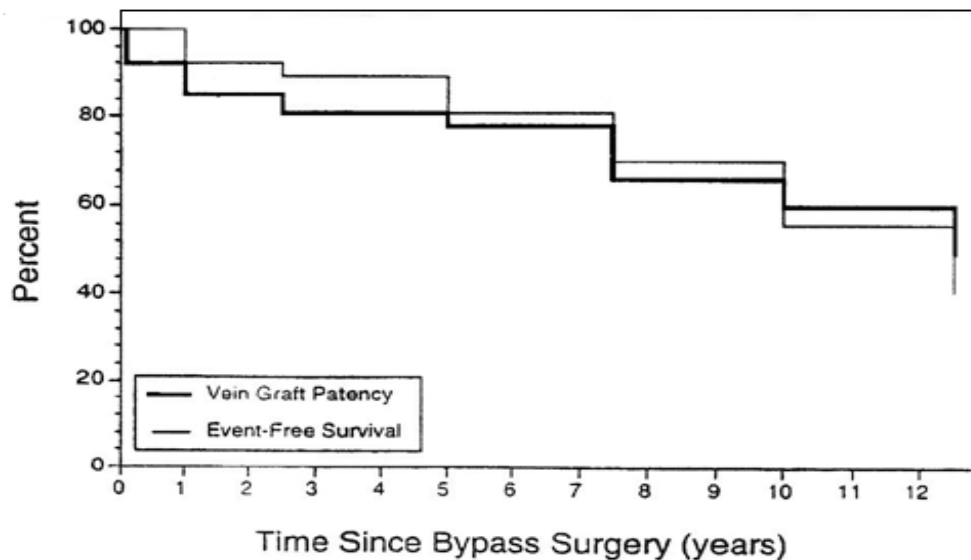


Abbildung 1: Prozentualer Venentransplantat Verschluss u. Patientenüberlebenszeit in Jahren nach stattgehabter ACVB Operation (nach Motwani und Topol, 1998)

1.3.2 Pathogenese

Der Verschluss des V. saphena magna Transplantats nach aortokoronarem Bypass ist zusammengesetzt aus drei unterschiedlichen Prozessen: Thrombose, intimale Hyperplasie und Arteriosklerose. Diese Trias wird als saphenous vein graft disease (SVGD) bezeichnet. Obwohl diese drei Prozesse zum Teil in verschiedenen zeitlichen Abschnitten stattfinden, sind sie doch pathophysiologisch miteinander verbunden (Motwani und Topol, 1998).

Daher bietet es sich an, den Verlauf der Erkrankung zu unterteilen:

- I. frühzeitiger Verschluss (< 1 Monat)
- II. mittelfristiger Verschluss (<5 Jahre)
- III. langfristiger Verschluss (>5 Jahre postoperativ)

1.3.2.1 Frühzeitiger Verschluss

Der frühzeitige Verschluss der transplantierten Vene, innerhalb der ersten 30 postoperativen Tage, wird bei 3 bis 12% der operierten Patienten festgestellt (Bourassa et al., 1991; Fitzgibbon et al., 1996). Zu diesem Zeitpunkt ist vor allem die Thrombose der Hauptgrund des Verschlusses. In Studien wurde anhand von Autopsien in bis zu 75% der Fälle eine Thrombose des Transplantats bei innerhalb des ersten postoperativen Monats verstorbenen Patienten nachgewiesen (Cox et al., 1991; Penny et al., 1988; Virmani et al., 1988). Die Einflüsse durch die Operation auf das Venentransplantat, die einen prothrombotischen Einfluß haben oder eine Thrombose bewirken, sind vielfältig. Es konnte nachgewiesen werden, dass bereits intraoperativ durch die Präparation der Vene mechanische Traumen am Endothel entstehen, die prothrombotisch wirken. Diese Verletzungen können z.B. durch die Aufdehnung der Vene mittels Katheter oder die Prüfung des Venentransplantats auf Leckagen mittels Perfusion mit hohem Druck entstehen (Baumann et al., 1981; Catinella et al., 1982; Fonkalsrud et al., 1978; Gundry et al., 1980; Hofer et al., 1981; Jones et al., 1973).

Es hat sich gezeigt, dass diese morphologischen Schäden zu einem Verlust der endothelabhängigen vasomotorischen Funktionen führen. So beeinflusst die intraoperative Manipulation an der Vene die Produktion von hämostatischen Faktoren und deren Konzentration in der Vene (Shuhaiber et al., 2002). Der Verlust bzw. die Verletzung des Endothels bewirkt an der Läsionsstelle eine lokale Anhäufung von Fibrin, Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten (Dilley et al., 1992a, 1992b) Verrier und Boyle, 1996). Das freiliegende Subendothel aktiviert die extrinsische Gerinnung durch Freisetzung von t-PA (Tissue plasminogen aktivator). Denudierte oder skelettierte Venen reagieren hochgradig auf zirkulierende vasokonstriktive Substanzen, wie z.B. Endothelin-1. Darüber hinaus produzieren solche geschädigten Venen bedeutend weniger relaxierendes EDRF (Endothel Derived Relaxing Faktor) (Barboriak et al., 1974; Verrier und Boyle, 1996). Es kommt daher zu einer vermehrten Venenkontraktion.

Die interponierten Venenstücke verändern die Art des intravasalen Blutflusses womit das Risiko einer Thrombusbildung ansteigt. So zeigten Studien, dass mit geeigneten Insertionswinkeln und angepassten Gefäßdurchmessern des Transplantats das Auftreten von turbulenten Strömungen vermindert werden kann (Einav und Vidne, 1985).

Zusammengefasst lassen sich die Gründe der Venenthrombose nach aortokoronarem Bypass mit der schon 1856 von Virchow formulierten Trias: Schäden der Venenwand, Störungen in der Blutgerinnung und Veränderungen des Blutflusses erklären. Daher ist die Folgerung vieler Studien, dass die Präparation der Venen nach der so genannten „no Touch“ Technik erfolgen sollte. Hierbei sollte die Präparation der Vene mit minimaler manueller und instrumenteller Manipulation erfolgen, um das Entstehen von Läsionen zu minimieren (Gottlob, 1977). Des Weiteren soll es vermieden werden, Venen in Lösungen aufzubewahren, die durch unphysiologische Verhältnisse bezüglich pH-Wert, onkotischem Druck oder zu niedriger Temperatur Schäden am Endothel hervorrufen (Bush et al., 1984; Hickethier et al., 1999; Solberg et al., 1987; Parolari et al., 1997).

Tabelle 3: Mediatoren des frühen Venenverschlusses (nach Cox et al., 1991)

Verletzung der Vene durch die operative Gewinnung <ul style="list-style-type: none"> • Direktes mechanisches Trauma • Durchtrennung der Vasa Vasorum
Perioperativer Stress des Venentransplantats <ul style="list-style-type: none"> • Kontakt mit Aufbewahrungslösung mit niedrigem onkotischem Druck • Hypotherme Aufbewahrung • Übermäßige und lang andauernde Dehnung
Chirurgische Techniken <ul style="list-style-type: none"> • Kompression und Verdrehung der Vene durch Nahtverläufe • Koronare Arteriosklerose an der Anastomosenstelle • Inadäquater distaler Blutabfluß • Dissektion der distalen Anastomose
Sonstige <ul style="list-style-type: none"> • Aktivierung von Thrombozyten und Leukozyten durch die Herzlungenmaschine • Diskrepanz zwischen Venendurchmesser und Arteridurchmesser • Plötzlicher arterieller Druckanstieg

1.3.2.2 Mittelfristiger Verschluss

Intimale Hyperplasie ist die universelle Antwort der Venen auf Transplantation in den arteriellen Kreislauf (Davies und Hagen, 1995). Sie entsteht bei nahezu allen Bypässen innerhalb der ersten vier bis sechs Wochen postoperativ und verengt das Lumen häufig bis zu 25% (Motwani und Topol, 1998). Obwohl sich die intimale Hyperplasie häufig als ein selbst limitierender Prozeß darstellt und meist innerhalb der ersten zwei Jahre zum Erliegen kommt, beobachtet man zuweilen in umschriebenen Bereichen signifikante Stenosen (Berkowitz et al., 1992; Chervu und Moore, 1990; Ip et al., 1990; Sayers et al., 1993).

Der genaue Pathomechanismus der intimalen Hyperplasie ist noch bei weitem nicht geklärt, jedoch geht man davon aus, dass es sich um ein multifaktorielles Geschehen handelt. Es werden physikalische, zelluläre und humorale Faktoren einhergehend mit Dysfunktion der endothelialen Regulation diskutiert (Allaire und Clowes, 1997; Chervu und Moore, 1990; Clowes et al., 1989; IP et al., 1990). Der Ablauf der intimalen Hyperplasie kann in drei Abschnitte unterteilt werden:

1. Proliferation der glatten Muskelzellen in der Media
(vascular smooth muscle cells = VSMC)
2. Migration der VSMC von der Media in die Intima
3. Intimale Expansion

1.3.2.2.1 Proliferation der glatten Muskelzellen in der Media

Bei der intimalen Hyperplasie kommt es initial zu einer Proliferation der glatten vaskulären Muskelzellen der Media. Es gibt zwei Arten von VSMC. Der differenzierte, kontraktile Typ beinhaltet vor allem α -Aktin und Myosin. Er hat eine niedrige Proliferationsrate. Der undifferenzierte, synthetisierende Typ ähnelt stark fötalen VSMC und Fibroblasten. Dieser Zelltyp produziert ca. vier- bis fünfmal mehr extrazelluläre Matrix als der differenzierte Phänotyp und hat eine hohe Proliferationsrate (Kraiss, 1997). Angesichts der unterschiedlichen Proliferationsindices verwundert es nicht, dass in Bereichen mit intimaler Hyperplasie eine vermehrte Anzahl von VSMC des synthetisierenden Phänotyps und eine verminderte Anzahl von VSMC des kontraktilen Phänotyps nachgewiesen werden konnte (Lemson et al., 2000). Für diese

Ungleichverteilung erscheint ein Ungleichgewicht stimulierender und hemmender Faktoren verantwortlich zu sein. So produzieren gesunde venöse Endothelien Substanzen, darunter Prostacycline, Heparin, Stickstoffmonoxid und natriuretische Peptide, welche eine antiproliferative Wirkung auf VSMC haben. Wenn jedoch das Endothel verletzt ist, bzw. streckenweise fehlt, führt dies zu einer Verminderung der antiproliferativen Wirkung (Kraiss, 1997).

Des Weiteren wurden einige im Umfeld agierende Substanzen identifiziert, die eine proliferative Wirkung auf VSMC haben, so z.B. PDGF (platelet-derived growth factor) (Jawien et al., 1992; Newby und George, 1993). Dieser Faktor wird sowohl von Thrombozyten als auch von Endothelien, Makrophagen und VSMC freigesetzt. Hierdurch entsteht mit zunehmender Proliferation und Hyperplasie des Venengewebes eine positive Rückkopplung. Die daraus resultierende vermehrte Ausschüttung bildet einen *circulus vitiosus*.

Des Weiteren scheinen Substanzen, die während einer Verletzung freigesetzt werden, eine wichtige Rolle im mittelfristigen Verschluss der Venenbypässe zu spielen. So konnte eine stark mitogene Wirkung des im Endothel und glatten Muskelzellen vorkommenden basic Fibroblast Growth Factors (bFGF) nachgewiesen werden und eine ähnliche Wirkung wird von den Substanzen Thrombin und Insulin-like Growth Faktor 1 (IGF-1) diskutiert (Lindner et al., 1991; Nguyen et al., 1994; Vashisht et al., 1992).

1.3.2.2.2 Migration der VSMC und Expansion der Intima

Im Laufe der saphenous vein graft disease kommt es zu einer Migration von VSMC von der Media in die Intima. Man geht davon aus, dass der PDGF (platelet-derived growth factor) hierfür eine Schlüsselrolle spielt, da dieser Faktor nicht nur stark proliferativ auf VSMC wirkt, sondern auch ausgesprochen chemotaktisch auf VSMC, Monozyten und Makrophagen wirkt (Newby et al., 1993).

Aufgrund der Einwanderung, Proliferation und relativer Überproduktion von extrazellulärer Matrix durch die VSMC kommt es zu einer intimalen Expansion. Hierbei ist es sehr interessant, dass das Verhältnis der Größenzunahme in einem direkten Verhältnis zum Grad der vorbestehenden intimalen Läsionen zu stehen scheint (Kohler et al., 1991). Es konnten in Arealen hyperplastischer Intima bis zu 20% aus der Media

eingewanderte VSMC nachgewiesen werden. Diese Areale bestehen zu 60-80% aus durch VSMC synthetisierter extrazellulärer Matrix.

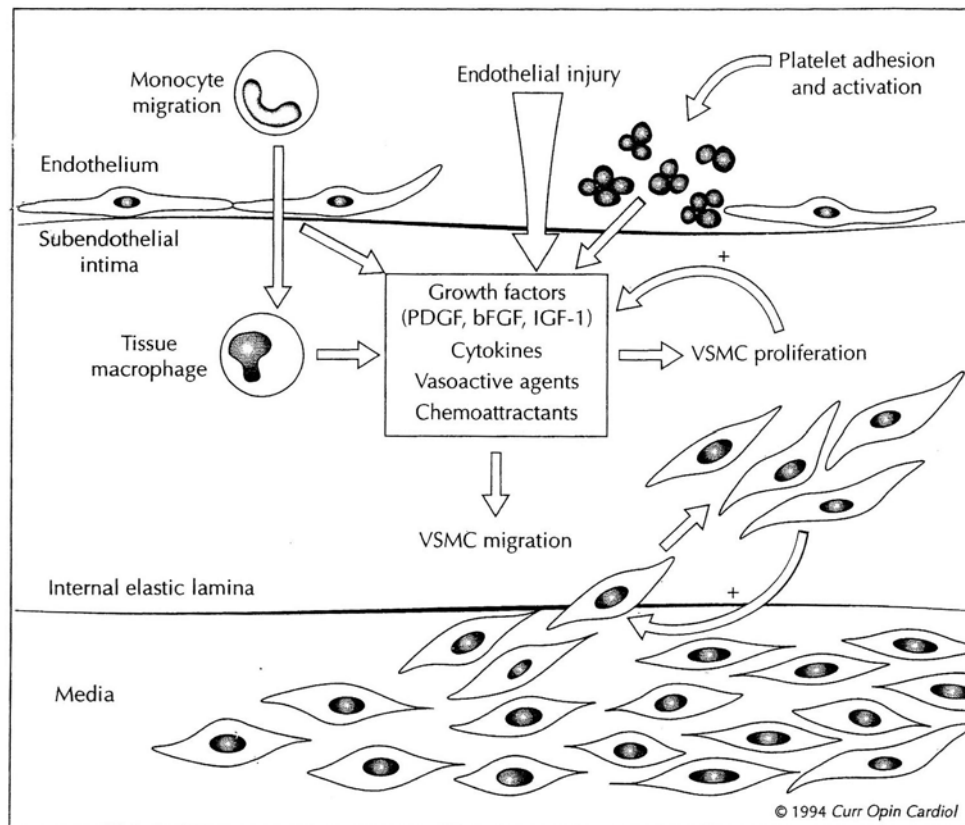


Abbildung 2: Die Pathophysiologie des V. saphena magna Verschlusses als aortokoronarer Venenbypass (nach Bryan und Angelini, 1994)

1.3.2.2.3 Die Rolle des Blutflusses und der Scherkräfte in der Pathogenese

Untersuchungen haben ergeben, dass Scherkräfte, die auf die Gefäßwände einwirken, einen Einfluss auf die Ausschüttung vasoaktiver Substanzen durch das Endothel haben (Ando et al., 1994; Hecker et al., 1993). Ein Teil dieser vasoaktiven Substanzen stimuliert die Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen, die für die Mediaverdickung mitverantwortlich sind (Busse und Fleming, 1998).

Die Scherkräfte, die auf die Gefäßwand einwirken, stehen in direkter Relation zu der Höhe des Blutflusses und der Viskosität, sowie in umgekehrter Relation zum Gefäßlumen. Wenn nun ein Venentransplantat dem arteriellen Druck ausgesetzt wird, steigt zwar einerseits der Blutfluss durch dieses Gefäß, andererseits kommt es zu einer

Gefäßaufdehnung. Da jedoch bei der Berechnung der auftretenden Kräfte nach dem Hagen-Poiseuille-Gesetz der Radius mit der dritten Potenz eingeht, kommt es meist effektiv zu einer Senkung der Scherkräfte in der Vene. Versuche haben gezeigt, dass Gefäße mit niedrigen Scherkräften, sowie Gefäße mit reduziertem Fluss, eine vermehrte intimale Hyperplasie entwickeln.

Der Umkehrschluss, dass hohe Blutflüsse und hohe Scherkräfte eine intimale Hyperplasie verhindern, ist jedoch nicht zulässig. Es wurde hier ebenfalls das Auftreten von intimaler Hyperplasie beobachtet. So erscheint es, dass jede Abweichung der Blutflüsse und der Scherkräfte, sei es nach oben oder nach unten, eine Induktion der intimalen Umbauprozesse bewirkt. Es wird vermutet, dass die Verdickung der Intima eine Reaktion darstellt, um physiologische Scherwerte wieder zu erreichen (Kohler et al., 1991; Lemson et al., 2000). Hierfür gibt es in zahlreichen Versuchen deutliche Hinweise (Dobrin et al., 1988, 1989; Schwartz et al., 1992).

1.3.2.3 Langfristiger Verschluss – Atherosklerose

Mitte der 80er Jahre lagen die ersten Langzeitdaten über die Verschlussraten venöser aortokoronarer Bypässe vor. Sie ergaben, dass es zu einer Steigerung der anfänglich beobachteten Verschlussraten von 1-2% pro Jahr in den ersten fünf postoperativen Jahren zu ca. 4% in den Jahren 6-11 postoperativ kam. Durchschnittlich waren nur 60% der Venenbypässe nach 11 Jahren offen. Arteriosklerose konnte nach 6 Jahren bei 17% der Transplantate und nach 11 Jahren in 46% der Fälle nachgewiesen werden (Bourassa et al., 1985).

Die Pathogenese, die histologische Morphologie und die Risikofaktoren der Atherosklerose des Venen-Bypasses ähneln prinzipiell der Atherosklerose bei Arterien. Es gibt jedoch bedeutende Unterschiede. So sind bei Venen die Läsionen meist diffus konzentrisch und erfassen dabei ca. 90-100% der Zirkumferenz des Transplantats. Im frühen Erkrankungsprozess können hohe Konzentrationen von Schaumzellen in der Nähe des Endothels und im späteren Krankheitsverlauf vermehrt extrazelluläres Lipid in der Intima der Vene nachgewiesen werden. In einem Großteil der Läsionen sind entzündliche Infiltrate in der Intima sichtbar, die aus Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen bestehen. Zum Teil wurden diese Zellen auch in der Media und der Adventitia beobachtet. Insgesamt ist die Anzahl der Entzündungszellen bei der Venen-

Atherosklerose höher als bei der arteriellen Atherosklerose, so dass mitunter auch ein immunologischer Aspekt in der Pathogenese diskutiert wird. Die Oberfläche der venösen Läsionen ist zerbrechlicher und es gibt keine „fibröse Kappe“, die die Läsionen vor den Einwirkungen des Blutstromes schützt (Rattliff et al., 1989).

Eine weitere Besonderheit der Venen-Atherosklerose ist die schnelle Progredienz der Erkrankung. Ursächlich hierfür erscheint einerseits eine chronische Endothelschädigung und Dysfunktion, andererseits jedoch auch die deutliche heterogene Eigenschaften der Venen (Boyle et al., 1997; Verrier und Boyle, 1996).

1.4 Vom Zelltod zur Apoptose

Die Entdeckung der Zelle durch Robert Hooke 1665, des Zellkerns 1831 durch den englischen Botaniker Robert Brown, der Benennung des Zellinneren als Protoplasma durch J. E. Purkinje 1839 und die Feststellung „Alle Lebewesen bestehen aus Zellen und Zellen stammen immer von Zellen ab“ haben unser Weltbild verändert (Brown, 1831; Hooke 1665; Schleiden et Schwann 1839; jeweils nach Harris, 1999). Die Tatsache, dass Zellen absterben können, wurde in Rudolph Virchows Zellulärpathologie unter dem Titel „Passive Vorgänge und Degeneration“ (Virchow, 1859) beschrieben und diskutiert. Die damals benutzten Begriffe „Degeneration, Erweichung, Nekrose und Absterben“ wurden synonym verwendet und entsprechen alle der heutigen Gangrän. Im Jahre 1880 beschrieb Carl Weigert, dass abgestorbene Zellen ihren Zellkern verlieren: „Diese Zellen lassen dann weder bei der Besichtigung in Glycerin oder wässrigen Medien, noch nach Zusatz von Essigsäure, noch nach Tinktionen innerhalb des Protoplasmas Kerne wahrnehmen. Wieso die Kerne in ihrer Individualität verschwinden vermag ich nicht zu sagen.“ (Weigert, 1880)

Seine Arbeiten veranlasste viele Kollegen seiner Zeit Untersuchungen zum Absterbeverhalten von Zellen durchzuführen. Viele Bezeichnungen und Beschreibungen wie die Randstellung des Chromatins, Karyolysis, Karyorhexis Pyknosis, und Autolysis stammen aus dieser Zeit (Arnheim, 1890; Flemming, 1885; Klebs, 1889; Schmaus, 1894).

Als verbesserte histologische Färbemethoden zur Verfügung standen, wurde der spontane Zelltod als ein physiologisches Ereignis zum ersten Mal diskutiert. Hierzu richtungweisend waren die Arbeiten von Walter Flemming 1885, der auch die Begriffe

Chromatin und Mitose prägte (Flemming, 1885). Er beschrieb Zellen, bei denen der Nukleolus aufgebrochen war und sich nur noch randständiges, pyknotisches Chromatin darstellen ließ. Flemming bezeichnete seine Beobachtungen als Chromatolysis. Retrospektiv betrachtet ist dies eine typische morphologische Beschreibung von apoptotischen Zellen. Der Embryologe Glücksmann erkannte, dass der Zelltod eine wichtige Rolle in der Embryogenese und Organogenese spielt. Er konnte die Meinung etablieren, dass zwischen physiologischem und pathologischem Zelltod unterschieden werden müsse (Glücksmann, 1951).

Dieser Paradigmenwechsel in der Klassifikation des Zelltodes regte viele Wissenschaftler zu Arbeiten und Versuchen zum „physiologischen Zelltod“ an. Es konnte anschließend in vielen verschiedenen Organsystemen der Nachweis von Zellelimination durch Apoptose erbracht werden. Um diese Form des präzise vorhersagbaren Todes von Zellen und Gewebsbezirken zu beschreiben, wurde der Begriff „programmierter Zelltod“ von Lockshin und Williams eingeführt. Der Begriff Apoptose (apo = ab, weg los; ptosis = Senkung) stammt aus dem Griechischen und bezeichnet den Fall der Blätter im Herbst (Lockshin und Williams, 1965).

Durch die detaillierte Beschreibung der morphologischen Veränderungen während der Apoptose durch Kerr im Jahre 1972 wurde die physiologische Zellelimination als eigenständige und genetisch kontrollierte Form des Zelltods anerkannt und der Begriff Apoptose geprägt (Kerr et al., 1972).

Aufgrund vieler neuer Erkenntnisse und neuer Konzepte wurden im Laufe der Zeit viele bis dato feststehende Bezeichnungen und Begriffe umdefiniert oder bekamen eine neue Bedeutung. Besonders beim Versuch der Abgrenzung von Apoptose gegen Nekrose kommt es bis heute immer wieder zu Verwechslungen und Verwirrungen, was den Pathologen E. Farber 1994 anlässlich einer Gegenüberstellung von Nekrose und Apoptose zu folgendem Schluß kommen ließ: Es gibt keinen Bereich der Zellbiologie und Zellpathologie, welcher verwirrender und unverständlicher ist als die Abgrenzung Nekrose gegen Apoptose (Farber, 1994).

1.5 Spezifische Merkmale der Apoptose im Bezug auf Nekrose

Bei der Nekrose handelt es sich um einen zwangsläufigen pathologischen Prozess. Sie zeichnet sich durch ein primäres Versagen metabolischer Prozesse aus, in deren

Konsequenz die zelluläre Energieversorgung zusammenbricht. Das daraus resultierende Versagen der Ionenpumpen bewirkt den Verlust der Membranintegrität (Majno und Joris, 1995). Morphologisch imponiert die Nekrose daher zuerst als Zellschwellung und später als willkürlicher, ungeordneter Auflösungsprozess der Zelle. Es kommt hierbei im Gegensatz zur Apoptose zu einer schnellen Freisetzung von Zellwand-Bestandteilen, Zytoplasma und Zellorganellen. Bei der darauf folgenden entzündlichen Begleitreaktion kommt es zu einer Ödembildung und Leukozyteninfiltration im umliegenden Gewebe.

Die Apoptose stellt die physiologische Zellelimination von Geweben dar. Sie ist ein präzise geregelter, genetisch festgelegter Prozess, welches sich durch eine Vielzahl von Aktivierungssignalen, Modifikationsmöglichkeiten und redundanten Schritten auszeichnet. Hierzu findet sich bei jedem Zelltyp eine gemeinsame, zentrale Effektormaschinerie. Diese besteht aus einer Kaskade spezifischer Proteasen, der so genannten Caspasen, deren Aktivität an allen zellulären Veränderungen apoptotischer Zellen beteiligt ist. Durch sie kommt es zu einer enzymatischen DNS-Fragmentierung in Bruchstücke der Größe von vorzugsweise 180 bis 200 Basenpaare oder ein entsprechendes Vielfaches davon (Holtz und Heinrich, 1999). Die Zelle bildet eine Vielzahl von Pseudopodien, die zum Teil diese Fragmente beinhalten. Des Öfteren kommt es zu Abschnürungen dieser Pseudopodien zu Vesikeln. Diese werden daraufhin von benachbarten Zellen oder Makrophagen phagozytiert. Durch diese Prozesse kommt es zu der für die Apoptose typischen Zellschrumpfung und Pyknose mit Randstellung des Kerns.

Für den determinierten Ablauf der Apoptose ist die Synthese von Proteinen nötig, was einen ATP verbrauchenden Prozess darstellt. Daher stellt die Apoptose im Gegensatz zur Nekrose einen aktiven und damit energieverbrauchenden Prozess dar (Leist et al., 1997; Nicotera et al., 1998). Reize, die zur Apoptose oder Nekrose führen, sind unter anderem Ischämie, Hypoxie, freie Radikale sowie Mangel bzw. Entzug von zellulären Wachstumsfaktoren (Hirsch et al., 1997).

Es stellt sich nun die Frage, wann der Zelltod durch Apoptose und wann durch Nekrose stattfindet. Neben der Reizstärke und Reizdauer ist der intrazelluläre ATP-Gehalt dafür entscheidend, ob eine geschädigte Zelle durch einen spezifischen Reiz apoptotisch oder nekrotisch degeneriert. Milde pathologische Reize führen bei ausreichenden ATP-

Reserven häufig zu einer apoptotischen Reaktion, während stärkere, pathologische Reize zu Nekrose führen. So konnte z.B. experimentell gezeigt werden, dass Zellen bei Kulturbedingungen von 43 bis 45°C apoptotisch degenerierten, während bei Temperaturen über 45°C deutliche Zeichen nekrotischer Degeneration auftraten (Lennon et al., 1991).

Es ist durchaus möglich, dass bei einem primär initiierten apoptotischen Prozess nach Erschöpfen der Energiereserven dieser nicht mehr weitergeführt werden kann und die Zelle dann sekundär nekrotisch degeneriert (Hirsch et al., 1997). Insbesondere bei stärkeren Reizen und verringerten ATP-Reserven können kombinierte Degenerationsformen d.h. sowohl apoptotische als auch nekrotische Zellen in demselben Gewebe gefunden werden (Portera-Cailliau et al., 1997). Somit können Apoptose und Nekrose als Varianten eines sich überschneidenden Spektrums des Zelluntergangs betrachtet werden (Hockenbery, 1995).

Tabelle 4: Unterschied zwischen Apoptose und Nekrose (nach Padosch et al., 2001)

Apoptose	Nekrose
physiologisch und pathophysiologisch genetisch determiniert energieabhängig Proteinbiosynthese notwendig keine Änderung des zellulären ATP-Gehalts [K ⁺] konstant, kein [Na ⁺] -Einstrom asynchroner Prozess einzelner Zellen zeitlich verzögerte aktive Degeneration Zellschrumpfung intakte Organellen Chromatinkondensation später Verlust der Membranintegrität keine entzündliche Begleitreaktion	pathophysiologisch nicht genetisch determiniert nicht energieabhängig verminderte Proteinbiosynthese Abfall des zellulären ATP-Gehalts Abfall des Membranpotentials [K ⁺] -Verlust, [Na ⁺] -Einstrom synchrones Auftreten in mehreren Zellen unmittelbar eintretende passive Atrophie Zellschwellung Zerstörung von Zellorganellen Zerfall nukleare Chromatinstrukturen früher Verlust der Membranintegrität entzündliche Begleitreaktion

1.6 Rolle der Apoptose in der „Saphenous Vein Graft Disease“

Die genaue Rolle der Apoptose in der Entstehung der Saphenous Vein Graft Disease (SVGD) ist noch bei weitem unklar. Der Zelltod und hier speziell die Apoptose ist jedoch in der Transplantationsmedizin als eine zentrale Größe erkannt worden. So entscheidet unter anderem die Apoptose der Zellen über Funktion, Erhalt oder Abstoßung des Transplantats (Hirsch et al., 1998; Kageyama et al., 1998; Meyer et al., 1998; Schierle et al., 1999). Es ist bekannt, dass apoptotische Endothelien prokoagulativ sind und somit einen Risikofaktor für Thrombose darstellen (Bombeli et al., 1997; 1999).

Lange Zeit beschränkte sich die Aufmerksamkeit der Atheroskleroseforschung auf die Untersuchung der Apoptose im Rahmen der Atherosklerose bei Arterien. Hierzu wurden viele Erkenntnisse gewonnen und veröffentlicht (Bennett und Boyle, 1998; Best et al., 1999; Rossig et al., 2001). Da normalerweise Venen spontan keine Atherosklerose entwickeln, wurde mit dem Verschluss der V. saphena magna als Bypassstransplantat von einer so genannten „Arterialisierung“ der Vene ausgegangen (Kockx et al., 1994). Diese Übertragung der Pathogenese der arteriellen Atherosklerose auf die Pathogenese der SVGD ist jedoch nicht zulässig (Cox et al., 1991). Daher wird nun seit einigen Jahren speziell nach dem Pathomechanismus des Verschlusses der Venen geforscht.

Als erstes gelang es Kockx 1994 in explantierten, atherosklerotisch veränderten Venenbypässen Apoptose nachzuweisen. Er identifizierte in den zellarmen hyperplastischen Media Zellen, die den morphologischen Kriterien der Apoptose entsprachen (Kockx et al., 1994). Diese Daten wurden von Wang bestätigt. Er konnte darüber hinaus differenzierend feststellen, dass innerhalb atherosklerotisch veränderten Plaques der Zelltod primär durch Nekrose und nicht durch Apoptose erfolgt (Wang et al., 2000; 2001).

Die Bemühungen in der Erforschung der Rolle der Apoptose bei der Entstehung der Vein Graft Disease verlagert sich immer mehr in die perioperative und kurzfristig postoperative Phase. Mayr belegt in seinen Versuchen, dass Apoptose unter anderem zu den ersten Ereignissen nach einer Bypassoperation gehören. Er konnte nachweisen, dass der biomechanische Stress, der durch die arteriellen Blutflüsse und Drücke auf die transplantierte Vene entsteht, Apoptose induziert (Mayr et al., 2000). In den Arbeiten von Rodriguez aus dem Jahr 2000 wurde das Augenmerk auf die ersten 48

postoperativen Stunden gelegt. Hierzu wurde am Tiermodell das Verhalten der glatten und nicht glatten Muskelzellen in den Venenbypässen untersucht. In seinen Experimenten wurden nach acht Stunden die höchsten Apoptoseraten gemessen. Sie stieg bei den glatten Muskelzellen (SMC) auf bis zu 14,5% und bei den nicht glatten Muskelzellen (NSMC) auf bis zu 49,9% an. In demselben Untersuchungszeitraum erfolgte eine Steigerung der NSMC Proliferation von 6,4 auf bis zu 23%, wobei die Proliferation der SMC konstant unter 2% blieb. Rodriguez folgerte daraus, dass die Umstrukturierung der Media durch Elimination der SMC mittels Apoptose erfolgt und dass die Zellen durch NSMC ersetzt werden. Daher legt er nahe, dass die Media durch Proliferationshemmung der NSMC und durch Verringerung oder Verhinderung der Apoptose von SMC in ihrer Struktur gewahrt werden sollte (Rodriguez et al., 2000).

O'Brien untersuchte am Schweinmodell die Veränderungen der V. saphena magna im arteriellen Kreislauf innerhalb der ersten 90 postoperativen Tage. Er konnte Apoptose zu einem frühen postoperativen Zeitpunkt nachweisen. Aus dem Verlust der Muskelzellen aus der Media und der konsekutiven Wundheilungsreaktion innerhalb der ersten 90 Tage folgerte O'Brien, dass die perioperative Periode die Hauptdeterminante für die spätere histomorphologische Erscheinung der Media ist (O'Brien et al., 1998).

2. Aufgabenstellung

Um das Risiko des Entstehens der saphenous vein graft disease möglichst gering zu halten, ist nach Sichtung der hierzu publizierten Literatur die gängige Forderung der Autoren, dass die Apoptoserate innerhalb des Transplantats möglichst gering gehalten werden sollte.

Eine veränderbare Einflussgröße auf das Veneninterponat ist die Auswahl und die Zusammensetzung der Aufbewahrungslösung, in der die Vene zwischen Entnahme und Implantation aufbewahrt wird. Es konnte nachgewiesen werden, dass in Abhängigkeit vom benutzten Aufbewahrungsmediums und des Aufbewahrungszeitraumes, die Apoptoserate stark variiert (Trieb et al., 1997). Hieraus ergibt sich die Aufgabe, ein Aufbewahrungsmedium zu finden, welches die geringste Apoptoserate in allen Zellschichten hervorruft.

Seit 1950 wird Medium 199 Lösung als klassisches Nährmedium für Zellkulturen und hier im Speziellen für Endothelien benutzt. Da im Rahmen des Entstehens der saphenous vein graft disease die Unversehrtheit des Endothels eine sehr wichtige Rolle spielt, erscheint es sinnvoll, Medium 199 als Aufbewahrungslösung zu benutzen.

Eine weithin vertretene These ist, dass es aufgrund einer perioperativen Hypoxie zu einer Schädigung des Transplantates kommt.

Ziel dieser Studie ist es, anhand der quantitativen Bestimmung apoptotischer Venenzellen über 90 Minuten festzustellen, ob menschliche V. saphena magna Transplantate besser in nativer M199 Lösung oder in zusätzlich oxygenierter M199 Lösung konserviert werden.

3. Material und Methoden

3.1 Patientenkollektiv

Bei insgesamt 60 Patienten (45 männlichen und 15 weiblichen) wurde während einer koronaren Bypassoperation ein jeweils 2 cm langes Teilstück der präparierten V. saphena magna untersucht. Dieses wurde aus überschüssigem Venenmaterial gewonnen, welches ansonsten ohnehin verworfen worden wäre. Für die experimentelle Verwendung dieser Venenreste lag die Zustimmung der Patienten vor.

Das Patientkollektiv hatte ein Durchschnittsalter von 64,13 ($\pm 10,89$) Jahren. Im Schnitt wurden 2,1 Venen-Bypässe und 0,85 Mammaria-Bypässe pro Patient gelegt. Bei diesem Patientenkollektiv kamen als Risikofaktoren Hypercholesterinämie (76,6%), Hypertonie (75%), Nikotinabusus (63,3%) und Diabetes (31,6%) vor. Der durchschnittliche Body Mass Index lag bei 27,75 kg/m².

Tabelle 5: Risikofaktoren, Befunde und Medikation des präoperativen Patientenkollektivs

Risikofaktoren u. Befunde	%	Medikation	%
Hypercholesterinämie	76,6	β-Blocker	78,0
Hypertonie	75,0	ACE-Hemmer	66,0
Angina Pectoris	71,6	Thrombozytenaggregationshemmer	65,0
Nikotinabusus	63,3	Orale Nitrate	65,0
Diabetes	31,6	Diuretika	35,0
Herzinfarkt	31,6	Ca-Antagonisten	15,0
Familiäre Disposition	25,0	Digitalis	8,0
COPD	18,3	Coumarine	3,3
Linksherzinsuffizienz	11,6		

3.2 Versuchsaufbau

Die ca. 2 cm langen Venenproben wurden direkt nach Absetzen der Vene intraoperativ gewonnen. Von den jeweiligen Enden wurde ein jeweils 1mm langes Teilstück mit Hilfe einer Mikrotomklinge (Feather: Microtome Blades S35 Type) entfernt und verworfen, da diese Enden durch chirurgisches Material wie z.B. Pinzetten, Clips, Ligaturen etc. beschädigt worden sein könnten. Anschließend wurden die Proben ohne zeitliche Verzögerung in die auf Eis gebetteten, mit Medium 199 Earle (Biochrom AG) gefüllten, Küvetten gelegt. Die Temperatur des Mediums 199 lag während der Lagerung der Venenprobe im Durchschnitt bei 6,23°C ($\pm 1,51$). Bei 30 der insgesamt 60 Venenproben wurde das Medium 199 durch Einleiten von Sauerstoff zusätzlich oxygeniert. Hierdurch stieg der Sauerstoffpartialdruck von 280-300 mmHg auf durchschnittlich 1229,62 ($\pm 83,39$) mmHg an. Ab dem Einlegen des Venenstücks in die Aufbewahrungslösung wurde mit der Zeitmessung begonnen. Zu den Zeitpunkten 15, 30, 45, 60 und 90 Minuten wurde jeweils von den Venen ein ca. 1-2 mm breites Venensegment mit einer Mikrotomklinge abgetrennt und das verbleibende Venenstück wieder zurückgelegt. Die so gewonnenen Venenproben wurden dann in eine entsprechend beschriftete Einbettkassette gelegt und danach durch Lagern in gepufferter 4% Formalin-Lösung für mindestens 24 Stunden bei 7°C fixiert.

Tabelle 6: Chemische Zusammensetzung des Medium 199 u. der Earle Salze in mg/l
(nach Morgan et al., 1950 u. Biochrom AG 2008)

DL-Alanin	50	Uracil	0,3
L-Alanin·HCl	70	Xanthin	0,3
DL-Asparaginsäure	60	ATPNa ₂	1
L-Cystein·HCl	0,1	AMP	0,2
L-Cystein	20	Ascorbinsäure	0,05
L-Glutamin	100	Biotin	0,01
L-Glutaminsäure H ₂ O	150	Calciferol	0,1
Glycin	50	D-Ca-Pantotheat	0,01
L-Histidin·HCl	20	Cholinchlorid	0,5
L-Hydroxyprolin	10	Folsäure	0,01
DL-Isoleucin	40	Myo-Inositol	0,05
DL-Leucin	120	Menadion	0,01
L-Lysin·HCl	70	Nicotinsäure	0,025
DL-Methionin	30	Nicotinsäureamid	0,025
DL-Phenylalanin	50	p-Aminobenzoesäure	0,05
L-Prolin	40	Pyridoxal HCl	0,025
DL-Serin	50	Pyridoxin HCl	0,025
DL-Threonin	60	Riboflavin	0,01
DL-Tryptophan	20	Thiamin·HCl	0,01
L-Tyrosin	40	DL- α -Tocopherolphosphat·Na ₂	0,01
DL-Valin	50	Vitamin A	0,1
Glutathion	0,5	Cholesterin	0,2
Natriumacetat	50	2-Desoxy-D-Ribose	0,5
Fe(NO ₃) ₂ ·H ₂ O	0,7	D-Ribose	0,5
Tween 80	20	Hypoxanthin	0,3
Adeninsulfat	10	Thymin	0,3
Guanin HCl	0,3	NaCl	6800
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	140	KCl	400
CaCl ₂	200	MgSO ₄ ·7H ₂ O	200
Phenolrot	17	D-Glucose	1000
NaHCO ₃	2200		

3.3 Herstellung der mikroskopischen Schnitte

Nach Formalinfixierung der Venensegmente erfolgte die Einbettung der Proben mittels Einbettautomaten im pathologischen Institut der Rheinischen Friedrich–Wilhelms-Universität Bonn in Paraffin. Von jeder Venenprobe wurden jeweils 5 histologische Schnitte mit einer Schichtdicke von 3 µm angefertigt. (Leica SM2000R Mikrotom)

Anschließend wurden die auf beschriftete Objektträger (Super Frost Plus Menzel-Gläser) aufgebrachten Gewebsschnitte im Inkubator bei 52°C für mindestens 48 Stunden zum Trocknen aufbewahrt.

3.4 Hämatoxylin-Eosin Färbung (H. E. -Färbung)

Pro Venenprobe wurde jeweils eine der fünf angefertigten mikroskopischen Schnitte zur Kontrolle der Schnittführung durch eine Hämatoxylin-Eosin Färbung eingefärbt. Hierzu wurden die Gewebeproben zunächst durch Eintauchen in Xylol entparaffiniert. Im Anschluss daran wurden sie durch eine absteigende Alkoholreihe geführt, um dann intensiv mit destilliertem Wasser gespült zu werden. Die darauf folgende fünfminütige Kernfärbung erfolgte mit Hämatoxylin. Nach gründlichem Spülen unter fließendem warmen Wasser erfolgte die Plasmafärbung mit Eosin für zwei Minuten. Nach weiterem kurzen Spülen in destilliertem Wasser wurden die Präparate zum Differenzieren in 70%igem Alkohol sechs Mal eingetaucht. Anschließend wurden die Proben kurz in 90%igem Alkohol eingetaucht, um sie, nachdem sie durch eine absteigende Alkoholreihe geführt wurden, insgesamt drei Mal in Xylol für jeweils sieben Minuten zu tauchen. Hiernach erfolgte das Eindeckeln der Präparate mit Entellan.

3.5 Durchführung des TUNEL-Testes

Zur Durchführung des TUNEL-Testes (TUNEL = terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling) mussten die Gewebeproben zuerst entparaffiniert werden. Dies geschieht, in dem die Objektträger mit den Proben dreimal in Xylol für jeweils sieben Minuten eingebracht werden. Im Anschluss daran folgte eine absteigende Alkoholreihe. Die Objektträger wurden drei Mal in 100%igen Alkohol für jeweils fünf Minuten und jeweils zwei Mal für fünf Minuten in 96%igem, 90%igem und 70%igem Alkohol eingebracht. Abschließend wurden die Objektträger zwei Mal für fünf Minuten mit destilliertem Wasser gespült. Die entparaffinierten Schnitte konnten nun dem

TUNEL-Test zugeführt werden. Hierfür mussten zuerst die einzelnen Lösungen und die notwendigen Puffer mit den entsprechenden Inhaltsstoffen und Konzentrationen sowie dem korrekt eingestellten pH-Wert angesetzt werden. Außerdem wurde jeder Gewebsschnitt mit einem Diamantstift umkreist und die Negativkontrolle markiert.

Der eigentliche TUNEL-Test verlief anschließend in mehreren Arbeitsschritten. Zuerst musste das Gewebe proteolysiert werden. Dafür wurde Proteinase K (PK) in der Konzentration 14 bis 22 mg/ml in 10 mM Tris-HCL mit einem pH Wert von 7,5 in einer Verdünnung von 1:1000 auf die Gewebeproben mit einer Eppendorf-Pipette aufgebracht und 30 Minuten bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden die Schnitte mit PBS zwei Mal für fünf Minuten gespült. Anschließend wurden die Proben mit fetalem Kälberserum (FCS) in einer Verdünnung von 1:25 für 30 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer versetzt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Das FCS wurde danach abgeklopft. Die aufgetauten TUNEL-Reagenzien wurden unmittelbar vor dem Gebrauch angesetzt. Hierzu wurden für die Negativkontrolle 100 µl der nativen Marker-Lösung (Nucleotid-Mix in Puffer) beiseite gestellt. Die restliche Marker-Lösung wurde mit Enzym Lösung (terminale Deoxynucleotidyl Transferase aus Kälberthymus in Puffer) gemischt. Diese Mischung wurde kurz mit dem Vortex durchmischt, anschließend kurz zentrifugiert und unmittelbar danach aufgetragen. Dann wurden die Präparate für zehn Minuten bei 37°C in einer Feuchtkammer inkubiert. Auf die Gewebeproben der Negativkontrollen wurde die native Marker-Lösung aufgetragen. Als Positivkontrolle lief entweder ein Thymuspräparat oder eine bereits als positiv bekannte Probe mit.

Hiernach wurden die Schnitte erneut zwei Mal für jeweils fünf Minuten mit PBS gespült. Im nächsten Schritt wurde das Gemisch aus Converter-alkalischer Phosphatase (aP) und Magermilchpulver-Puffer in einem Verhältnis von 1:1 aufgetragen und bei 37°C in der Feuchtkammer 30 Minuten lang aufbewahrt. Hierbei erfolgt die Bindung der Fluorescein-markierten DNA-Stränge an einen mit Anti-Fluorescein markierten, an AP konjugierten Antikörper, wodurch diese lichtmikroskopisch sichtbar gemacht werden. Nach erneutem Spülen mit PBS wurde das im Dunkeln gelöste Substrat „Fast Red“ aufgetragen. Dieses Substrat wirkte nun 30 Minuten lang im Dunkeln und bei Raumtemperatur auf die Probe ein. Anschließend wurde die Probe sechs Minuten lang mit destilliertem Wasser gewässert. Zum Schluss erfolgte die Kern-Gegenfärbung mit

Mayer's Hämalan für sieben Sekunden. Die Entwicklung des Farbstoffs erfolgte durch fünf- bis zehnminütiges Spülen mit fließendem, lauwarmen Leitungswasser. Hiernach wurden die Proben auf den Objektträgern mit einem wasserlöslichen Eindeckmittel (Aquatex) fixiert. Zur Qualitätssicherung wurde die Negativkontrolle auf lila gefärbte Zellkerne und die Positivkontrolle auf positive, mit einem roten Signal markierte, pyknotische Kerne mittels Lichtmikroskop untersucht.

3.6 Bildgewinnung und Auswertung

Die nach dem TUNEL-Verfahren gefärbten mikroskopischen Schnitte wurden auf apoptotische Zellen hin untersucht. Hierfür wurden bei jeder der 300 Venenproben jeweils die vier Schichten der Vene (Endothel, Subendothel, Media und Adventitia) zu den Zeitpunkten 15, 30, 45, 60 u. 90 Minuten bei 40facher Vergrößerung unter dem Mikroskop (Olympus BX41) begutachtet und jeweils pro Schicht fünf Gesichtsfelder mit Hilfe einer digitalen Kamera abgelichtet (Olympus Camedia C-3030, 3.3 Megapixel). Die so entstandenen 6000 Bilder wurden anschließend einer digitalen Bildanalyse unterzogen. Mit der hierfür benutzten Bildanalyse-Software (AnalySIS 3.0 Soft Imaging System (SIS)) wurde die Apoptoserate im Venengewebe bestimmt. Hierzu wurden einerseits die roten Signale der TUNEL-positiven Zellen und andererseits die blauschwarzen Zellkerne der TUNEL-negativen Zellen als Farbschwellwert benutzt. Anhand dieser charakteristischen Farbschwellwerte konnte das Programm in einer manuell eingegebenen definierten Region (ROI = Region of Interest) entsprechend den Vorgaben Partikel zählen und vermessen.

Es wurden folgende Daten ermitteln: die Fläche des ROI in μm^2 , die Anzahl der Partikel (Zellen) im ROI insgesamt, die Dichte der Partikelgesamtheit $1/\mu\text{m}^2$ und die Anzahl der Partikel, die den definierten Vorgaben entsprachen. Die als TUNEL-positiv detektierten Zellen einer jeden Bildanalyse wurden anschließend jeweils manuell am Monitor verifiziert und auf die für die Apoptose typischen morphologischen Kriterien untersucht, um so die Anzahl falsch positiv und falsch negativ gezählter Zellen zu minimieren.

3.7 Statistische Methoden

Die Auswertung erfolgte mit den Werten der vier verschiedenen Wandkompartimente: Endothel, Subendothel, Media und Adventitia. Zur Berechnung der Summen, Mittelwerte

und Standardabweichung wurde Excel 2000 benutzt. Mit SPSS 10.0 für Windows wurde eine Varianzanalyse mit Messwiederholung durchgeführt. Die Messwiederholungen stellen hierbei die fünf Zeitpunkte dar, bei denen die Venenproben entnommen wurden. Da in beiden Gruppen jeweils verschiedene Venenstücke untersucht wurden, wurde je nach Versuchsgruppe natives oder oxygeniertes Medium 199 als unabhängiger Faktor gewählt. Bei den 11 Venenproben, die nicht auswertbar waren, wurden die fehlenden Werte linear interpoliert, da für die Varianzanalyse vollständige Verläufe gebraucht werden. Da es sich nur um eine geringfügige Anzahl von Werten handelte, waren diese Veränderungen statistisch nicht relevant.

4. Ergebnisse

4.1 Endothel

Im Endothel steigt der Anteil abgestorbener Zellen auf die höchsten Werte im Vergleich zu den anderen Wandkompartimenten. Die Streuung ist bei den frühen Zeitpunkten fast so hoch wie die Mittelwerte selbst. Bei den späteren Zeitpunkten sinkt die Streuung auf ca. die Hälfte der Mittelwerte.

Tabelle 7: Apoptoserate des Endothels über die Zeit in Abhängigkeit des Aufbewahrungsmediums

Lösung: Medium 199	Zeitpunkt	N	Mittelwert	Stand. Abw.
Ohne Sauerstoff	15 min	30	7,55	4,67
	30 min	30	7,84	4,34
	45 min	30	11,53	6,60
	60 min	30	15,05	6,36
	90 min	30	20,55	8,73
Mit Sauerstoff	15 min	30	5,11	4,23
	30 min	30	8,47	5,48
	45 min	30	9,29	6,58
	60 min	30	14,23	7,37
	90 min	30	23,90	11,47

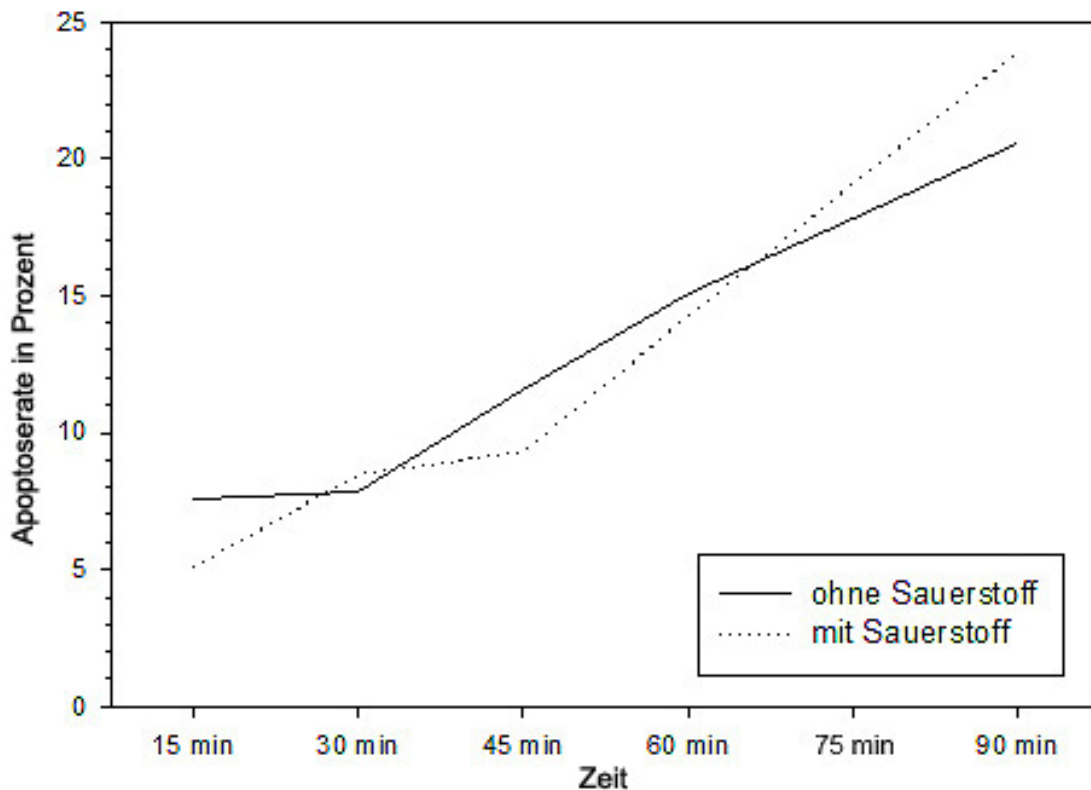


Abbildung 3: Anstieg der mittleren Apoptoserate endothelialer Zellen über die Zeit

Wie man auf der Abbildung 3 sieht, sind die Verläufe der beiden Medien sehr ähnlich. Die Varianzanalyse kommt zu dem Ergebnis, dass aufgrund der Überschneidungen der beiden Verläufe eine rein rechnerische Wechselwirkung zwischen den Faktoren Zeit und Medium ($p=0,047$) besteht.

Bei der Betrachtung der Graphik stellt man fest, dass beide Graphen sich in ihrer Form unterscheiden. Die Kurve von Medium 199, welches mit Sauerstoff versetzt wurde, ist eher konkav und die Kurve des Medium 199 ohne Sauerstoff erscheint eher konvex. Bei genauerer Betrachtung fällt jedoch auf, dass beide Verläufe in ihrer Tendenz gleich sind. Deswegen kann diese rein rechnerische Wechselwirkung in diesem speziellen Fall ignoriert werden. Anhand der Varianzanalyse kann ein Unterschied im zeitlichen Verlauf der Apoptoserate festgestellt werden ($p<0,001$); hierbei wird der Faktor Medium ignoriert. Die Verläufe steigen über die Zeit linear an. Im direkten Vergleich der im Endothel auftretenden Apoptoserate ergibt sich jedoch kein signifikanter Unterschied der beiden Medien zu einander ($p=0,793$).

Tabelle 8: Ergebnisse der Varianzanalyse für das Endothel

Wechselwirkung zwischen den Faktoren Zeit und Medium	p=0,047
Unterschied der Apoptoserate im zeitlichen Verlauf	p<0,001
Unterschied der beiden Medien zueinander	p=0,793

4.2 Subendothel

Die Werte im Subendothel liegen deutlich niedriger als im Endothel. Die Streuung ist wiederum sehr hoch - auch bei den späteren Zeitpunkten liegt die Streuung bei ca. $\frac{3}{4}$ des Mittelwerts.

Tabelle 9: Apoptoserate des Subendothel über die Zeit in Abhängigkeit des Aufbewahrungsmediums.

Lösung	Zeitpunkt	N	Mittelwert	Stand. Abw.
Ohne Sauerstoff	15 min	30	3,40	2,94
	30 min	30	3,08	2,61
	45 min	30	5,00	3,00
	60 min	30	5,94	5,09
	90 min	30	7,78	5,93
Mit Sauerstoff	15 min	30	2,44	2,60
	30 min	30	3,01	3,06
	45 min	30	3,14	2,61
	60 min	30	4,87	4,39
	90 min	30	7,02	5,20

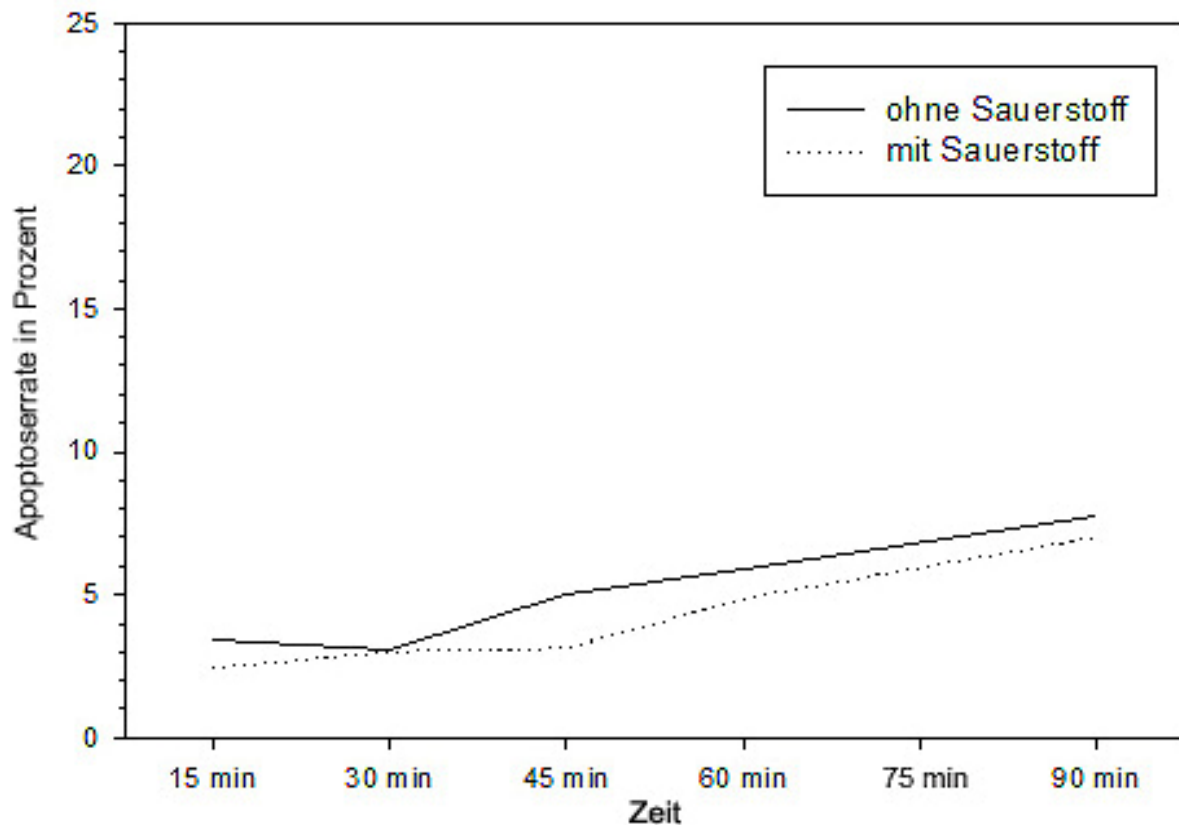


Abbildung 4: Anstieg der mittleren Apoptoserate subendothelialer Zellen über die Zeit

Anhand der Varianzanalyse kann man feststellen, dass es keine Wechselwirkung zwischen den Faktoren Zeit und Medium gibt ($p=0,664$). Die Verlaufsformen sind daher ähnlich. Es wird ein Unterschied im zeitlichen Verlauf der Apoptoserate festgestellt ($p<0,001$); hierbei wird der Faktor Medium ignoriert. Die Verläufe steigen über die Zeit linear an. Für das Subendothel konnte kein Unterschied der gemessenen Apoptoseraten in Abhängigkeit vom verwendeten Medium festgestellt werden ($p=0,176$).

Tabelle 10: Ergebnisse der Varianzanalyse für das Subendothel

Wechselwirkung zwischen den Faktoren Zeit und Medium	$p=0,664$
Unterschied der Apoptoserate im zeitlichen Verlauf	$p<0,001$
Unterschied der beiden Medien zueinander	$p=0,176$

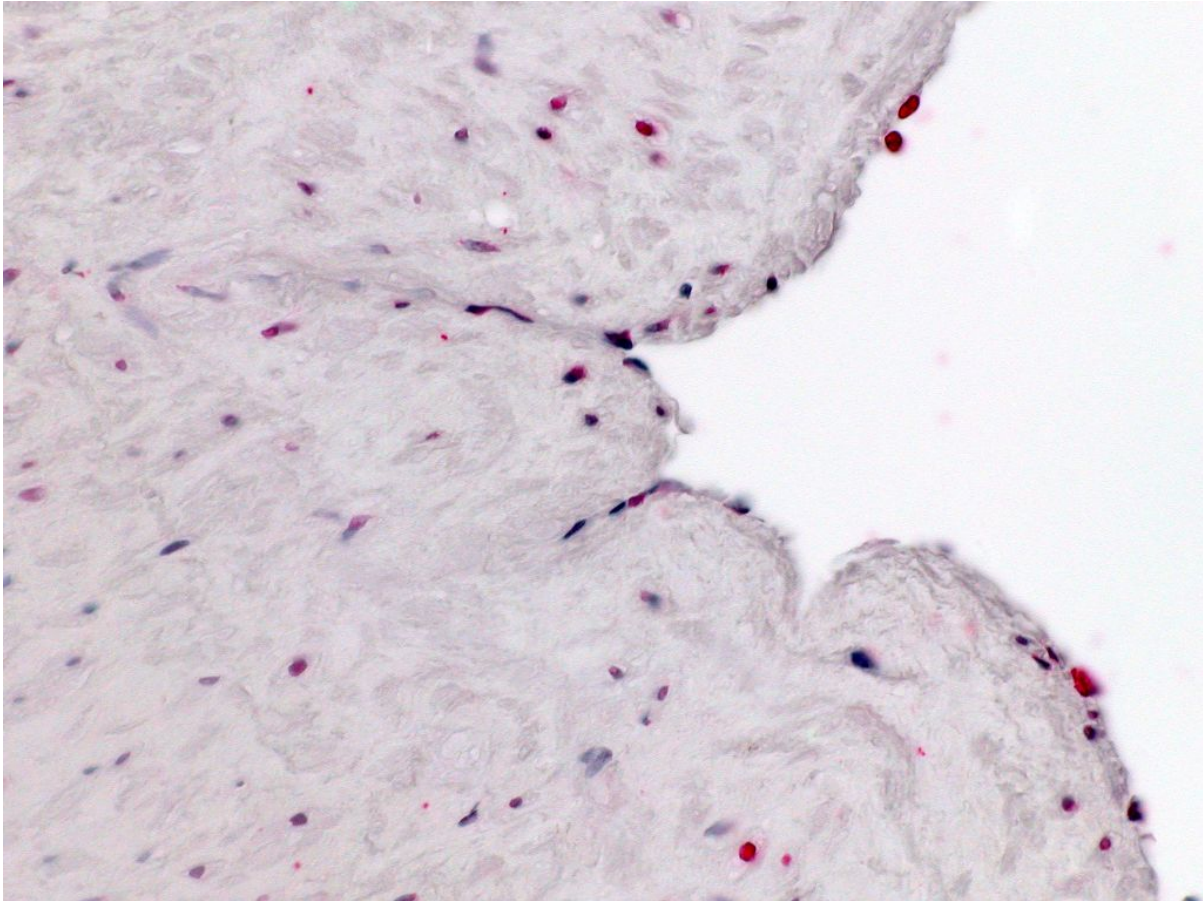


Abbildung 5: Mikroskopisches Gesichtsfeld des Endothels und des Subendothels mit rot gefärbten apoptotischen Zellen

4.3 Media

Die Apoptoserate in der Media ist bei beiden Versuchsgruppen im Verhältnis zu anderen Zellschichten am niedrigsten. Die Streuung der Werte entspricht ungefähr den Mittelwerten.

Tabelle 11: Apoptoserate der Media über die Zeit in Abhängigkeit des Aufbewahrungsmediums

Lösung	Zeitpunkt	N	Mittelwert	Stand. Abw.
Ohne Sauerstoff	15 min	30	1,51	1,78
	30 min	30	1,27	1,29
	45 min	30	1,61	1,04
	60 min	30	2,34	2,55
	90 min	30	2,73	2,09
Mit Sauerstoff	15 min	30	1,00	1,00
	30 min	30	1,14	1,23
	45 min	30	1,18	1,14
	60 min	30	1,91	1,43
	90 min	30	2,85	2,04

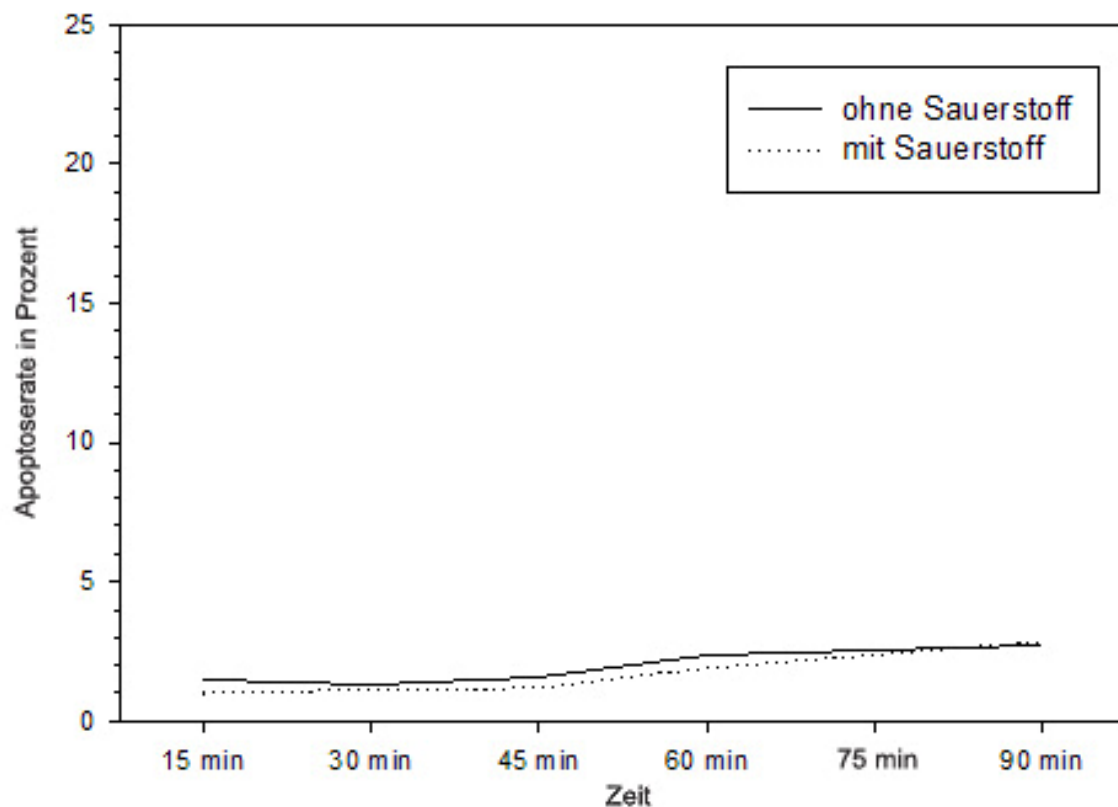


Abbildung 6: Anstieg der mittleren Apoptoserate der Mediazellen über die Zeit

Bei der Analyse der Werte ergeben sich aufgrund der Varianzanalyse folgende Ergebnisse: Es gibt keine Wechselwirkung zwischen den Faktoren Zeit und Medium ($p=0,561$). Daher sind die Verläufe der beiden Graphen zueinander sehr ähnlich. Die Verläufe selbst steigen, wenn auch nur sehr schwach, über die Zeit linear an ($p<0,001$). Es kann kein Unterschied der beiden Medien zueinander im Bezug auf die gemessenen Apoptoseraten festgestellt werden ($p=0,391$).

Tabelle 12: Ergebnisse der Varianzanalyse für die Media

Wechselwirkung zwischen den Faktoren Zeit und Medium	$p=0,561$
Unterschied der Apoptoserate im zeitlichen Verlauf	$p<0,001$
Unterschied der beiden Medien zueinander	$p=0,391$

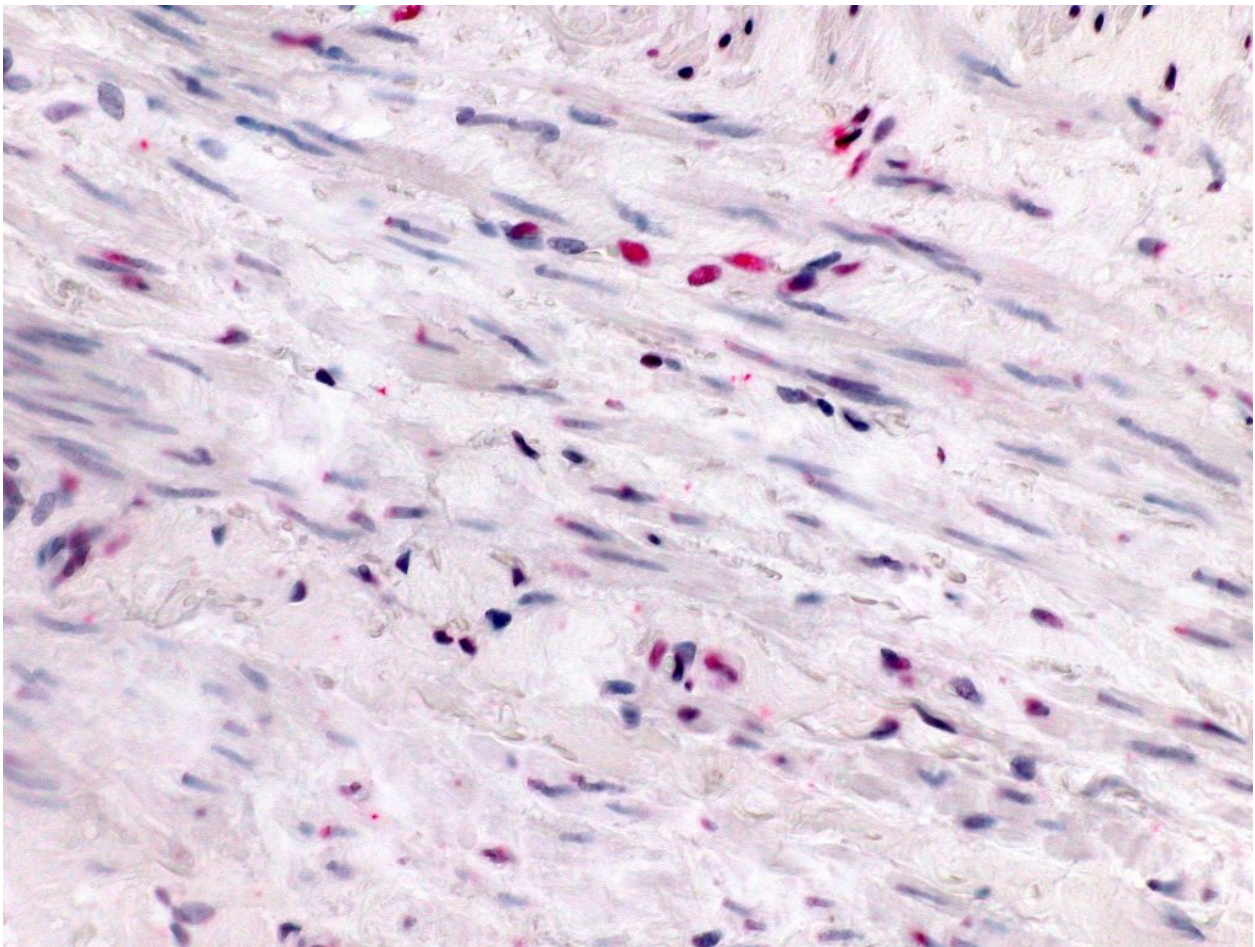


Abbildung 7: Mikroskopisches Gesichtsfeld der Media mit rot gefärbten apoptotischen Zellen

4.4 Adventitia

Die Prozentzahl der apoptotischen Zellen liegt in der Adventitia zwischen den Werten im Subendothel und denen in der Media. Die Streuung ist ähnlich hoch wie in den anderen Zellschichten.

Tabelle 13: Apoptoserate der Adventitia über die Zeit in Abhängigkeit des Aufbewahrungsmediums

Lösung	Zeitpunkt	N	Mittelwert	Stand. Abw.
Ohne Sauerstoff	15 min	30	5,12	2,40
	30 min	30	5,09	2,80
	45 min	30	6,72	3,34
	60 min	30	9,81	4,01
	90 min	30	14,57	5,36
Mit Sauerstoff	15 min	30	4,17	3,70
	30 min	30	6,22	4,50
	45 min	30	6,65	3,71
	60 min	30	10,41	6,20
	90 min	30	16,19	7,57

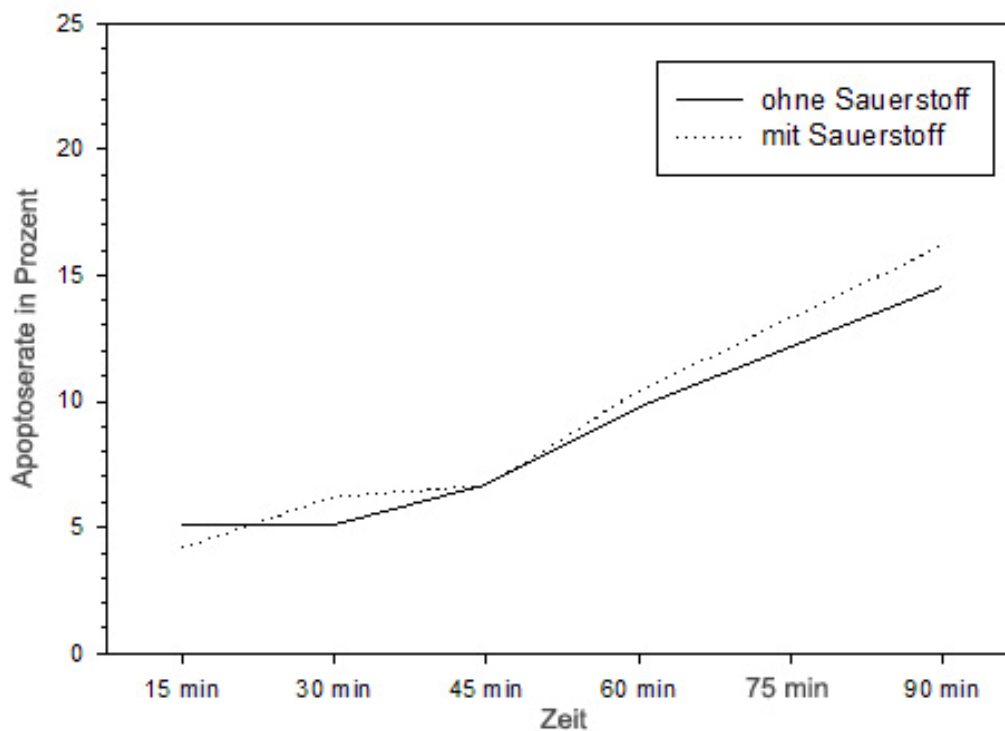
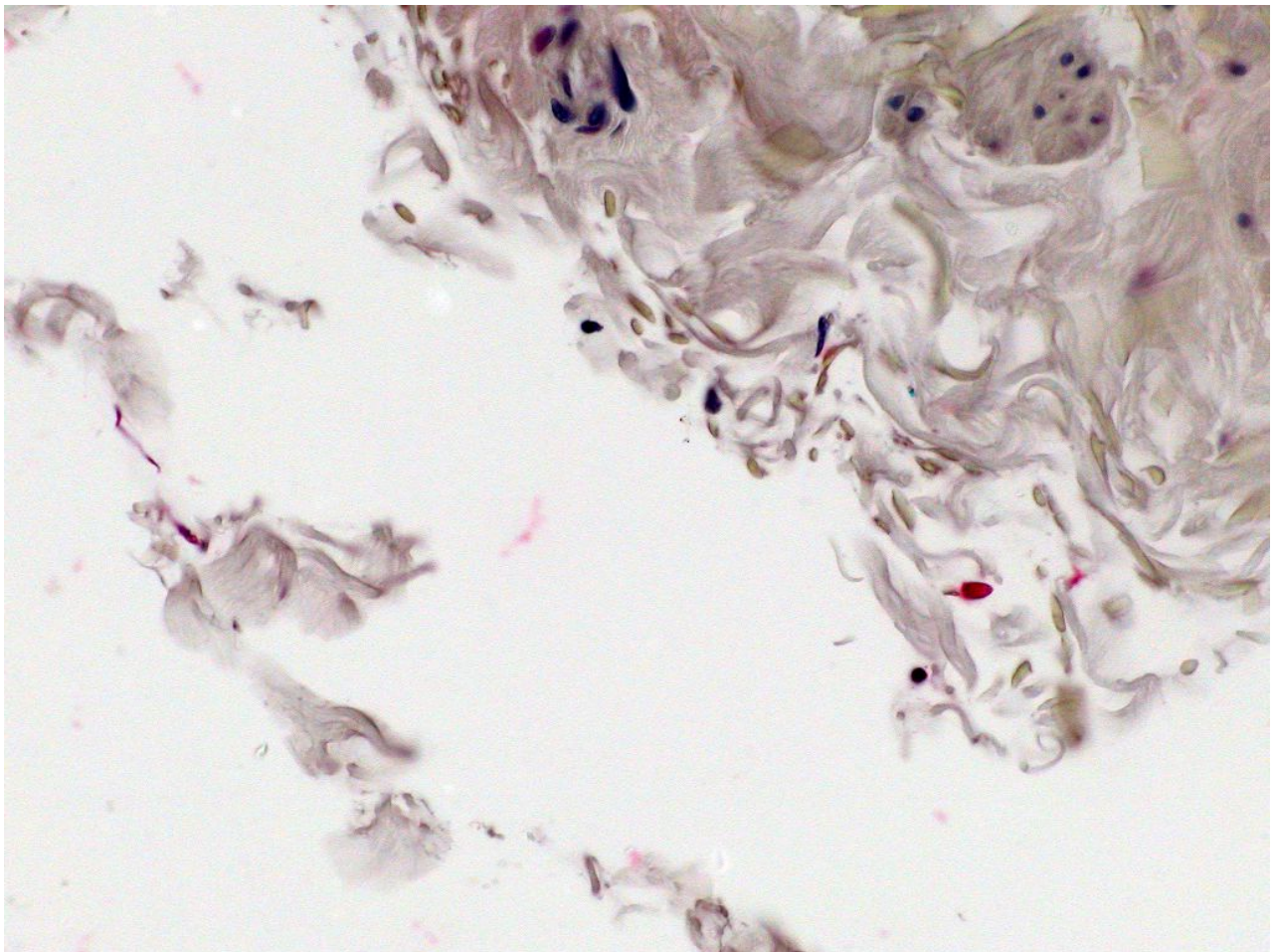


Abbildung 8: Anstieg der mittleren Apoptoserate der Adventitiazellen über die Zeit

Die Varianzanalyse kommt zu folgenden Ergebnissen: Es gibt keine Wechselwirkung zwischen dem Medium und der Zeit ($p=0,439$). Die Verläufe der beiden Medien sind sehr ähnlich. Die Verläufe selbst steigen linear über die Zeit an ($p<0,001$). Auch für die Adventitia konnte kein Unterschied der gemessenen Apoptoseraten in Abhängigkeit vom verwendeten Medium festgestellt werden ($p=0,534$).

Tabelle 14: Ergebnisse der Varianzanalyse für die Adventitia

Wechselwirkung zwischen den Faktoren Zeit und Medium	$p=0,439$
Unterschied der Apoptoserate im zeitlichen Verlauf	$p<0,001$
Unterschied der beiden Medien zueinander	$p=0,534$



● **Abbildung 9:** Mikroskopisches Gesichtsfeld der Adventitia mit rot gefärbten apoptotischen Zellen

4.5 Prozentuale Apoptoseraten (\bar{x}) in Abhängigkeit von der Zellschicht und der Ischämiezeit

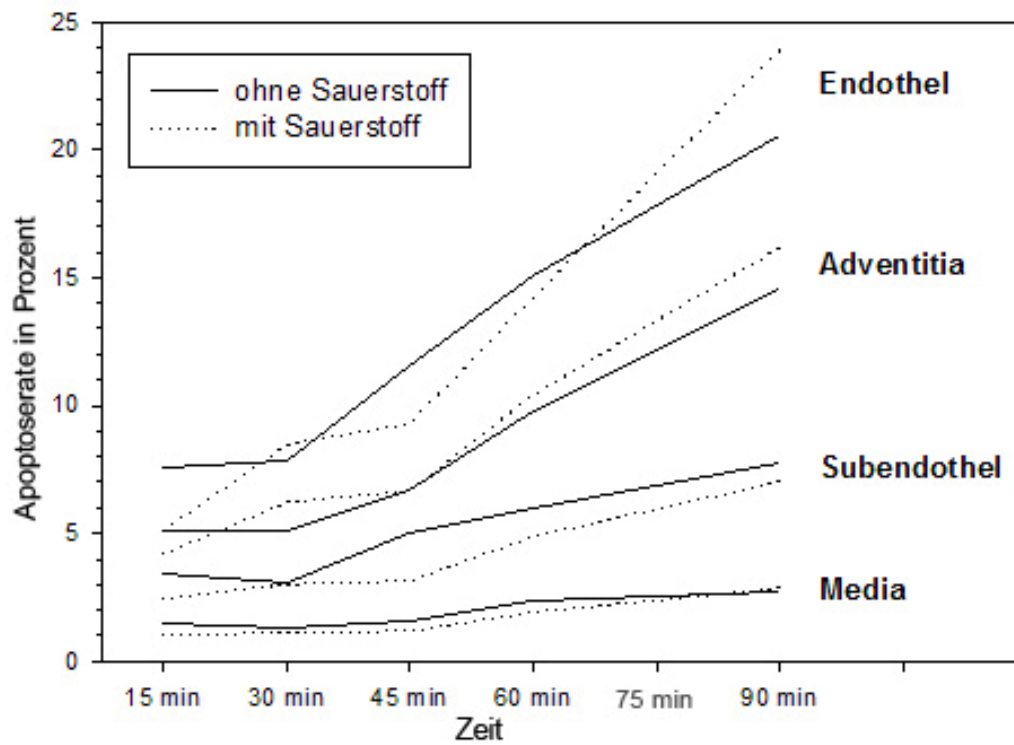


Abbildung 10: Prozentuale Apoptoseraten (\bar{x}) in Abhängigkeit von der Zellschicht und der Ischämiezeit

5. Diskussion

In dieser Arbeit wurde ein Studienansatz gewählt, der möglichst der klinischen Realität entspricht. So wurden die Untersuchungszeitpunkte entsprechend den üblichen intraoperativ anfallenden Wartezeiten zwischen Gewinnung und Implantation des Transplantats gewählt. Das Medium 199 wurde in dem laut Herstellerangaben vorgesehenen Temperaturbereich zur Aufbewahrung benutzt.

Der genaue Pathomechanismus der Stenosierung des Venentransplantats nach koronarer Bypassoperation und ihrer Prophylaxe verbleibt ungeklärt. Man geht jedoch davon aus, dass der unbeschädigte Zustand des Venentransplantats vor der Implantation unabdingbar für den langfristigen Erfolg der Revaskularisierung ist (Davies und Hagen, 1994). Da jedoch ein extensiver Verlust von Endothelzellen und SMC in der Intima und Media kurzzeitig nach der Venentransplantation festgestellt worden ist, wird immer mehr das Augenmerk auf die Rolle des Zelltods in Genese der Bypassvenenstenose gelegt (Kockx et al., 1994).

Um den quantitativen Verlauf des Zelltsterbens und hier im Speziellen der Apoptose im unmittelbaren perioperativen Zeitraum zu untersuchen, wurden mehr als 6000 mikroskopische Gesichtsfelder ausgezählt. Wenn man sich die Kurvenverläufe in Abbildung 10 anschaut, stellt man fest, dass die Anzahl apoptotischer Zellen unabhängig von der Versuchsgruppe in allen Schichten der Vene über den Verlauf des Versuchszeitraumes zunimmt. Dieser zunächst optische Eindruck konnte anhand der Varianzanalyse für alle vier Schichten der Vene auf einem hohen Signifikanzniveau von 0,1% ($p < 0,001$) nachgewiesen werden.

Beim Betrachten der Kurvenformen ergibt sich angesichts der insgesamt hohen Standardabweichung der Messwerte ein linearer Verlauf des Apoptoserateanstieges im Medium 199. Bei der genauen Analyse der Ergebnisse fällt auf, dass in den Zellschichten, welche die Grenzfläche der Venen zur Umgebung bilden, die höchste Anzahl an apoptotischen Zellen nachgewiesen werden konnte. Interessanterweise gilt dieses sowohl für den gesamten Untersuchungszeitraum als auch für beide Untersuchungsgruppen. Man kann hieraus Hinweise auf die Zytotoxizität des Mediums

199 ziehen. So ist schon zum ersten Analysezeitpunkt nach 15 Minuten ein deutlich höherer Apoptoseindex im Endothel und in der Adventitia als in der Media und dem Subendothel nachweisbar. Der Apoptoseindex des Endothels ist im Verhältnis zum Subendothel ca. doppelt so hoch. Beim Vergleich der Adventitia mit der Media liegt das Verhältnis der apoptotischen Venenzellen bei einer Größenordnung von ca. 3:1.

Es ist durchaus vorstellbar, dass dieser bedeutende Unterschied zwischen den äußeren und den inneren Venenschichten aus einem direkten zytotoxischen Effekt des Mediums 199 resultiert. Es überrascht, dass die meisten apoptotischen Zellen im Endothel nachgewiesen wurden, da Medium 199 ursprünglich als Nährlösung zur Kultivierung von Endothelzellen entwickelt wurde und tatsächlich heute ein Standardmedium zur Zucht von Endothelzellen ist. (Hickethier et al., 1999; Kloss und Bohnke, 1991; Maciag et al., 1982). Es stellt sich daher die Frage, ob andere Arbeiten mit Medium 199 als Aufbewahrungslösung ähnliche Ergebnisse hervorbrachten und wie diese im Vergleich zu anderen Aufbewahrungslösungen einzuordnen sind.

Bei Analyse der Datenlage ist festzustellen, dass ein direkter Vergleich mit anderen Arbeiten nicht möglich ist, da es keine anderen publizierten Arbeiten mit einem identischen Versuchsaufbau gibt. Bei den wenigen Arbeiten mit einem ähnlichen Versuchsaufbau konnte Medium 199 jedoch als Aufbewahrungslösung überzeugen.

In einer Arbeit von Hickethier, in der im direkten Vergleich Venenproben in 0,9% Kochsalzlösung und Medium 199 zur Konservierung für 45 Min. eingelagert wurden, konnte anhand des anschließend gemessenen Grades der Endothelschädigung die Überlegenheit des Medium 199 gegenüber der Kochsalzlösung festgestellt werden (Hickethier et al., 1999). In den Arbeiten von Alamanni wurden aus Vena saphena magna gewonnene Endothelzellen über einen Zeitraum von 6 Stunden bei 4°C in unterschiedlichen Lösungen aufbewahrt. Nach diesem Zeitraum konnte ein signifikanter Zellverlust bei den Lösungen Eurocollins und St. Thomas festgestellt werden, während kein signifikanter Zellverlust bei Medium 199, Celsior und University of Wisconsin festgestellt werden konnte (Alamanni et al., 2002).

Generell lässt sich sagen, dass es angesichts der veröffentlichten Untersuchungen sehr schwer ist, bisweilen sogar unmöglich Aussagen über die Qualität verschiedener Lösungen zur Aufbewahrung von Venen zu machen. Dies liegt nicht nur daran, dass

sich die meisten Versuchsaufbauten zu sehr unterscheiden, sondern auch daran, dass die Methoden stark variieren, die zur Beurteilung der Zellschädigung und damit der Qualität des Aufbewahrungsmediums gewählt wurden. So wird je nach Versuchsansatz die Kontraktionsfähigkeit, die Relaxationsfähigkeit, die licht- bzw. elektronenmikroskopischen Veränderungen oder die Färbbarkeit mit verschiedensten Färbemethoden als Maßstab der Zellschädigung genommen (Anastasiou et al., 1997; Boerboom et al., 1992; Chester et al., 1998; Fremes et al., 1991; Grohs et al., 1996; Hickethier et al., 1999; Konerding et al., 1996; Sanchez et al., 1994; Schaeffer et al., 1997; Thatte und Khuri, 2001; Wagner, 1990; Welz, 1991; Zerkowski et al., 1993). Daher überrascht es nicht, dass es auch nach Jahren leidenschaftlicher Diskussion viele verschiedene und zum Teil sich gänzlich widersprechende Empfehlungen gibt, wie Venen am besten aufbewahrt werden sollten. Obwohl ein starker Dissens über die beste Aufbewahrungslösung und Temperatur deutlich ist, besteht breiter Konsens darüber, dass eine perioperative Hypoxie als eine der Ursachen für die Schädigung des Endothels angesehen werden kann (Forman et al., 1989; Motwani und Topol, 1998; Thatte und Khuri, 2001; Zilla et al., 1993). Letztendlich bezieht sich diese Meinung auf Arbeiten, bei denen morphologische Schäden am Endothel nach Lagerung in Kochsalzlösung beschrieben wurde und Ischämie sowie Hypoxie als pathologisches Agens vermutet wurden (Svendsen et al., 1985; 1986).

Es ist erstaunlich, dass diese Vermutung scheinbar unkritisch übernommen wurde und auch nicht nach der Veröffentlichung von Daten, die diese These in Frage stellen, erneut diskutiert wurde. Im Jahre 1992 publizierte Dregelid eine Arbeit, in der Venensegmente während ihrer Aufbewahrung auf Hypoxie hin untersucht wurden. Hierzu wurden in unterschiedlichen Versuchsgruppen Venensegmente, deren Ende in einer Versuchsgruppe verschlossen wurden, in arteriellem Blut oder Kochsalzlösung aufbewahrt. Über den Verlauf von einer Stunde wurde wiederholt der pO_2 , pCO_2 sowie der pH-Wert innerhalb des Venenlumens gemessen. Diese Daten wurden anschließend mit den rasterelektronenmikroskopisch festgestellten morphologischen Endothelschäden korreliert. Es wurde festgestellt, dass weder Hypoxie noch Hyperkapnie innerhalb des untersuchten Zeitraumes auftrat. Des Weiteren war der Endothelschaden bei den in Blut gelagerten Venen größer, als bei denen, die in Kochsalz gelagert wurden (Dregelid et al., 1992).

Ziel dieser Arbeit ist es festzustellen, ob es durch zusätzliche Oxygenierung des Mediums 199 während der 90-minütigen Aufbewahrung der Vena saphena magna Transplantate zu einer signifikanten Veränderung des Verlaufes und der Höhe des Zellunterganges kommt. Hierzu wurde in der ersten Testreihe der Anstieg der Apoptoserate des Venengewebes bei nativem Medium 199 als Aufbewahrungsmedium gemessen. In der zweiten Testreihe wurde der Sauerstoffgehalt des Medium 199 durch Einleiten von Sauerstoff von 280-300 mmHg auf durchschnittlich 1229,62 (\pm 83,39) mmHg angehoben. Für alle Schichten in beiden Testreihen steigt die Anzahl apoptotischer Zellen über die Zeit hochsignifikant an ($p < 0,001$).

Bei der Betrachtung der Kurvenverläufe in Abbildung 10 entsteht der Eindruck, dass innerhalb der ersten 30 Minuten in allen Schichten der Anstieg des Apoptoseniveaus zunächst eine Plateauphase durchläuft, um anschließend stark anzusteigen.

In der Versuchsgruppe, in der das oxygenierte Medium 199 eingesetzt wurde, erscheint derselbe Kurvenverlauf um einen Messpunkt später zeitversetzt zu sein. Dieser rein optische Unterschied im Verlauf der beiden Kurven konnte jedoch mittels statistischer Prüfung nicht bestätigt werden. Die Verläufe der Kurven beider Versuchsgruppen sind für die Schichten Subendothel ($p=0,664$), Media ($p=0,561$) und Adventitia ($p=0,439$) ähnlich. Überraschenderweise ergibt sich im Endothel ein rechnerischer Zusammenhang zwischen der Art des Mediums und dem Verlauf der Kurven bei einem Signifikanzniveau von 5% ($p=0,047$). Bei Betrachtung der Graphen fällt jedoch auf, dass die Verläufe sich einerseits extrem ähnlich sind, andererseits sich mehrfach kreuzen. Durch diese Überschneidungen entsteht ein statistischer, jedoch in diesem Falle nicht reeller Zusammenhang. Daher kann auch hier von einem ähnlichen Verlauf des Anstiegs apoptotischer Zellen über die Zeit ausgegangen werden.

Um zu prüfen, ob aus dem Einleiten von Sauerstoff in Medium 199 eine signifikante Veränderung der Apoptoserate gegenüber nativem Medium 199 resultiert wurde, wurden die Ergebnisse auf einen Zusammenhang zwischen dem Medium und dem Anteil abgestorbener Zellen hin analysiert. Hierfür wurde der Faktor Zeit ignoriert. Angesichts der sehr hohen p-Werte (Endothel $p=0,793$ / Subendothel $p=0,176$ / Medium $p=0,391$ / Adventitia $p=0,534$) kann mit hoher Signifikanz ein unterschiedlicher Einfluss der beiden Medien auf die auftretende Apoptoserate ausgeschlossen werden. Aufgrund dieser Ergebnisse erscheinen die Ergebnisse der Arbeit von Degreid bestätigt.

Abschließende Aussagen über die Güte des Medium 199 als Aufbewahrungslösung für die kurzfristige Lagerung von Venensegmenten können auch anhand dieser Studie nicht gemacht werden. Die Erhöhung des Sauerstoffpartialdruckes in dem Medium 199 hat keinen Einfluss auf den Zelluntergang von Venenzellen durch Apoptose. Für eine bis dato postulierte perioperative hypoxische Venenschädigung ergeben sich keine Hinweise.

6. Zusammenfassung

Anhand der Langzeitergebnisse der kardialen Bypasschirurgie musste festgestellt werden, dass der venöse Bypass nur palliativer Natur ist. In Studien konnte gezeigt werden, dass 10 Jahre postoperativ nur noch 60% der venösen Bypässe offen sind. Hiervon zeigten lediglich 50% keine signifikanten Stenosen (Bourassa, 1991; Campeau, et al. 1984; Fitzgibbon et al., 1996). Der genaue Pathomechanismus der Bypassvenenstenose ist unklar. Man geht jedoch davon aus, dass der unbeschädigte Zustand des Venentransplantats vor der Implantation entscheidend für den langfristigen Erfolg der Revaskularisierung ist (Davies und Hagen, 1994).

In dieser Studie wurde die Veränderung des Anteils apoptotischer Zellen von Vena saphena magna Transplantaten während 90 minütiger Lagerung in der Lösung Medium 199 in Abhängigkeit von ihrem Oxygenierungsgrad gemessen. Jede Testreihe umfasste 30 Proben. In der ersten Testreihe wurde natives Medium 199 benutzt und in der zweiten Testreihe wurde der Sauerstoffgehalt des Mediums 199 durch Einleiten von Sauerstoff von 280-300 mmHg auf durchschnittlich 1229,62 ($\pm 83,39$) mmHg angehoben. Es wurde jeweils zu den Zeitpunkten 15, 30, 45, 60 und 90 Minuten Proben gewonnen und hieraus mikroskopische Präparate hergestellt. Durch Anfärbung mit TUNEL-Reagenz wurden apoptotische Zellen immunhistochemisch markiert. Pro Zeitpunkt und Venenschicht wurden jeweils fünf mikroskopische Gesichtsfelder mittels Digitalkamera abfotografiert. Die markierten apoptotischen Zellen wurden computergestützt ausgezählt und jeweils manuell nach morphologischen Kriterien verifiziert.

In beiden Versuchsgruppen stieg in allen Wandkompartimenten der Vene die Anzahl der apoptotischen Zellen über die Zeit an ($p < 0.001$). Der höchste Anteil apoptotischer Zellen wurde konstant in den Schichten gemessen, die die Grenzschicht zu der Aufbewahrungslösung bilden, wobei sie im Endothel höher sind als in der Adventitia. Bei den inneren Zellschichten ist der erreichte Anteil apoptotischer Zellen in der Media am Geringsten. Anhand der Varianzanalyse mit Messwertwiederholung wurde überprüft, ob sich die Ergebnisse der beiden Versuchsreihen signifikant unterscheiden. Es konnte für keine anatomische Schicht der Vene ein Unterschied im Absterbeverhalten der Zellen

durch Apoptose aufgrund der zusätzlichen Oxygenierung des Medium 199 festgestellt werden, weder quantitativ noch im zeitlichen Verlauf. Für eine bis dato postulierte perioperative hypoxische Venenschädigung als Ursache einer Zellschädigung ergeben sich keine Hinweise.

7. Literaturverzeichnis

- Alamanni F, Parolari A, Visigalli R, Bussolati O, Rubini P, Sala R, Bonati L, Gazzola GC, Biglioli P, Dall'Asta V. Endothelial cell injury induced by preservation solutions: a confocal microscopy study.
Ann Thorac Surg 2002; 73: 1606-1614
- Alderman EL, Corley SD, Fisher LD, Chaitman BR, Faxon DP, Foster ED, Killip T, Sosa JA, Bourassa MG. Five-year angiographic follow-up of factors associated with progression of coronary artery disease in the Coronary Artery Surgery Study (CASS). CASS Participating Investigators and Staff.
J Am Coll Cardiol 1993; 22: 1141-1154
- Allaire E, Clowes AW. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: the intimal hyperplastic response.
Ann Thorac Surg 1997; 63: 582-591
- Anastasiou N, Allen S, Paniagua R, Chester A, Yacoub M. Altered endothelial and smooth muscle cell reactivity caused by University of Wisconsin preservation solution in human saphenous vein.
J Vasc Surg 1997; 25: 713-721
- Ando J, Ohtsuka A, Katayama Y, Korenaga R, Ishikawa C, Kamiya A. Intracellular calcium response to directly applied mechanical shearing force in cultured vascular endothelial cells.
Biorheology 1994; 31: 57-68
- Arnheim G. Coagulationsnekrose und Kernschwund.
Virchows Arch Pathol Anat 1890; 120: 367: 383
- Barboriak JJ, Pintar K, Korn ME. Atherosclerosis in aortocoronary vein grafts.
Lancet 1974; 2: 621-624
- Baumann FG, Catinella FP, Cunningham JN Jr., Spencer FC. Vein contraction and smooth muscle cell extensions as causes of endothelial damage during graft preparation.
Ann Surg 1981; 194: 199-211
- Beck C. Production of a collateral circulation to the heart.
Soc Exp Biol Med 1935; 32: 759-761
- Beck C. Development of new blood supply to heart by operation.
Ann Surg 1935; 102: 801-813

Bennett MR, Boyle JJ. Apoptosis of vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1998; 138: 3-9

Berkowitz HD, Fox AD, Deaton DH. Reversed vein graft stenosis: early diagnosis and management.

J Vasc Surg 1992; 15: 130-141

Best PJ, Hasdai D, Sangiorgi G, Schwartz RS, Holmes DR, Jr., Simari RD, Lerman A. Apoptosis. Basic concepts and implications in coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 14-22

Biochrom AG Zusammensetzung von M199 <http://www.biochrom.de/index.php/de/Common/Document/field/document/id/119?PHPSESSID=13d79e102c8362edaf96b09df07e5973> (download 17.6.2008)

Arch Intern Med 1933; 52: 165-225

Blumgart H, Riseman J. Therapeutic effect of total ablation of normal thyroid on congestive heart failure and angina pectoris.

Arch Intern Med 1933; 52: 165-225

Boerboom LE, Wooldridge TA, Olinger GN, Rusch NJ. Effects of storage solutions on contraction and relaxation of isolated saphenous veins.

J Cardiovasc Pharmacol 1992; 20 Suppl 12: 80-84

Bombeli T, Karsan A, Tait JF, Harlan JM. Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant.

Blood 1997; 89: 2429-2442

Bombeli T, Schwartz BR, Harlan JM. Endothelial cells undergoing apoptosis become proadhesive for nonactivated platelets.

Blood 1999; 93: 3831-3838

Bourassa MG, Fisher LD, Campeau L, Gillespie MJ, McConney M, Lesperance J. Long-term fate of bypass grafts: the Coronary Artery Surgery Study (CASS) and Montreal Heart Institute experiences.

Circulation 1985; 72: V71-V78

Bourassa MG. Fate of venous grafts: the past, the present and the future.

J Am Coll Cardiol 1991; 17: 1081-1083

Boyle EM, Jr., Lille ST, Allaire E, Clowes AW, Verrier ED. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: atherosclerosis.

Ann Thorac Surg 1997; 63: 885-894

Bruckenberg E. Herzbericht 2002/ 2003.

Bryan AJ, Angelini GD. The biology of saphenous vein graft occlusion: etiology and strategies for prevention.

Curr Opin Cardiol 1994; 9: 641-649

Bush HL, Jr., McCabe ME, Nabseth DC. Functional injury of vein graft endothelium. Role of hypothermia and distention.

Arch Surg 1984; 119: 770-774

Busse R, Fleming I. Pulsatile stretch and shear stress: physical stimuli determining the production of endothelium-derived relaxing factors
J Vasc Res 1998; 35: 73-84

Cameron AA, Davis KB, Rogers WJ. Recurrence of angina after coronary artery bypass surgery: predictors and prognosis (CASS Registry). Coronary Artery Surgery Study.
J Am Coll Cardiol 1995; 26: 895-99

Campeau L, Enjalbert M. The relation of risk factors to the development of atherosclerosis in saphenous-vein bypass grafts and the progression of disease in the native circulation. A study 10 years after aortocoronary bypass surgery.
N Engl J Med 1984; 311: 1329-1332

Carell A. On the experimental surgery of the thoracic aorta and heart.
Am J Surg 1910; 52: 83-95

Catinella FP, Cunningham JN, et al. The factors influencing early patency of coronary artery bypass vein grafts: correlation of angiographic and ultrastructural findings.
J Thorac Cardiovasc Surg 1982; 83: 686-700

Chervu A, Moore WS. An overview of intimal hyperplasia.
Surg Gynecol Obstet 1990; 171: 433-447

Chester AH, Buttery LD, Borland JA, Springall DR, Rothery S, Severs NJ, Polak JM,; Yacoub MH. Structural, biochemical and functional effects of distending pressure in the human saphenous vein: implications for bypass grafting.
Coron Artery Dis 1998; 9: 143-151

Clowes AW, Clowes MM, Fingerle J, Reidy MA. Regulation of smooth muscle cell growth in injured artery.
J Cardiovasc Pharmacol 1989; 14 Suppl 6: S12-S15

Cox JL, Chiasson DA, Gotlieb AI. Stranger in a strange land: the pathogenesis of saphenous vein graft stenosis with emphasis on structural and functional differences between veins and arteries.
Prog Cardiovasc Dis 1991; 34: 45-68

Davies MG, Hagen PO. Influence of perioperative storage solutions on long-term vein graft function and morphology.
Ann Vasc Surg 1994; 8: 150-157

Davies MG, Hagen PO. Pathophysiology of vein graft failure: a review.
Eur J Vasc Endovasc Surg 1995; 9: 7-18

De Mey JG, Vanhoutte PM. Heterogeneous behavior of the canine arterial and venous wall. Importance of the endothelium.
Circ Res 1982; 51: 439-447

Dilley RJ, McGeachie JK, Tennant M. (A) Vein to artery grafts: a morphological and histochemical study of the histogenesis of intimal hyperplasia.
Aust N Z J Surg 1992; 62: 297-303

Dilley RJ, McGeachie JK, Tennant M. (B) The role of cell proliferation and migration in the development of a neo-intimal layer in veins grafted into arteries, in rats.
Cell Tissue Res 1992; 269: 281-287

Dobrin PB, Littooy FN, Golan J, Blakeman B, Fareed J. Mechanical and histologic changes in canine vein grafts.
J Surg Res 1988; 44: 259-265

Dobrin PB, Littooy FN, Endean ED. Mechanical factors predisposing to intimal hyperplasia and medial thickening in autogenous vein grafts.
Surgery 1989; 105: 393-400

Dregelid E, Svendsen E, Sandberg S. Hypoxia does not occur during temporary storage of vein grafts in air-equilibrated solutions.
J Cardiovasc Surg 1992; 33: 143-148

Einav S, Avidor J, Vidne B. Haemodynamics of coronary artery-saphenous vein bypass.
J Biomed Eng 1985; 7: 305-309

Farber E. Programmed cell death: necrosis versus apoptosis.
Mod Pathol 1994; 7: 605-609

Favaloro RG. Saphenous vein graft in the surgical treatment of coronary artery disease. Operative technique.
J Thorac Cardiovasc Surg 1969; 58: 178-185

FitzGibbon GM, Kafka HP, Leach AJ, Keon WJ, Hooper GD, Burton JR. Coronary bypass graft fate and patient outcome: angiographic follow-up of 5,065 grafts related to survival and reoperation in 1,388 patients during 25 years.
J Am Coll Cardiol 1996; 28: 616-626

Flemming W. Über die Bildung von Richtungsfiguren in Säugethiereiern beim Untergang von Graaf'scher Follikel.
Arch Anat EntwGesch 1885; 221-244

Fonkalsrud EW, Sanchez M, Zerubavel R. Morphological evaluation of canine autogeneous vein grafts in the arterial circulation.
Surgery 1978; 84: 253-264

Forman MB, Puett DW, Virmani R. Endothelial and myocardial injury during ischemia and reperfusion: pathogenesis and therapeutic implications.
J Am Coll Cardiol 1989; 13: 450-459.

Francois-Franck C. Signification physiologique de la resection du sympathique dans la maladie de basedow, l'epilepsie, l'idiotie et le glaucome.
Bull Acad Med Paris 1899; 41: 565-594

Fremes SE, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Tumati LC. Prolonged hypothermic cardiac storage with University of Wisconsin solution. An assessment with human cell cultures.
J Thorac Cardiovasc Surg 1991; 102: 666-672

Garrett HE, Dennis EW, DeBakey ME. Aortocoronary bypass with saphenous vein graft. Seven-year follow-up.
JAMA 1973; 223: 792-794

Glücksman A. Cell deaths in normal vertebrate ontogeny.
Biol Rev Camb Philos Soc 1951; 26: 59-86

Goetz RH, Rohman MHJD, Dee R, Rosenak SS. Internal mammary-coronary artery anastomosis-a nonsuture method employing tantalum rings.
J Thorac Cardiovasc Surg 1961; 41: 378-38

Gottlob R. The preservation of the venous endothelium by "dissection without touchin" and by an atraumatic technique of vascular anastomosis. The importance for arterial and venous surgery.
Minerva Chir 1977; 32: 693-700

Grohs JG, Kadletz M, Wodratzka M, Wolner E, Raberger G. Contractile function of human veins after long-term storage in different media.
J Cardiovasc Pharmacol 1996; 28: 89-93

Gundry SR, Jones M, Ishihara T, Ferrans VJ. Intraoperative trauma to human saphenous veins: scanning electron microscopic comparison of preparation techniques.
Ann Thorac Surg 1980; 30: 40-47

Gundry SR, Jones M, Ishihara T, Ferrans VJ. Optimal preparation techniques for human saphenous vein grafts.
Surgery 1980; 88: 785-794

Harken De, Black H, Dickson JF, III, Wilson HE, III. De-epicardialization: a simple, effective surgical treatment for angina pectoris.
Circulation 1955; 12: 955-962

Harris, H. The birth of the cell. New Haven & London: Yale University Press, 1999
Heberden W. Some account of a disorder of the breast.
Medical Transactions 1772; 2: 59-67, in: Echocardiography
<http://www2.umdj.edu/~shindler/heberden.html> (29.12.08)

Hecker M, Mulsch A, Bassenge E, Busse R. Vasoconstriction and increased flow: two principal mechanisms of shear stress-dependent endothelial autacoid release.
Am J Physiol 1993; 265: H828-833

Hickethier T, Dammrich J, Silber RE, Finster S, Elert O. Ultrastructural investigations for reducing endothelial cell damage of vein grafts during CABG-operation and practical consequences.
J Cardiovasc Surg 1999; 40: 71-76

Hirsch GM, Kearsey J, Burt T, Karnovsky MJ, Lee T. Medial smooth muscle cell loss in arterial allografts occurs by cytolytic cell induced apoptosis.
Eur J Cardiothorac Surg 1998; 14: 89-96

Hirsch T, Marchetti P, Susin SA, Dallaporta B, Zamzami N, Marzo I et al. The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death.
Oncogene 1997; 15: 1573-1581

Hockenbery D. Defining apoptosis.
Am J Pathol 1995; 146: 16-19

Hofer H, Mihatsch MJ, Guggenheim R, Amsler B, Hasse J, Graedel E. Morphologic studies in saphenous vein grafts for aorto-coronary bypass surgery. Part I: Morphology of the Graft using ordinary surgical preparation techniques.
Thorac Cardiovasc Surg 1981; 29: 32-37

Holtz J, Heinrich H. Apoptosis--what is it ? Significance in coronary heart disease and myocardial infarct.

Herz 1999; 24: 196-210

Ip JH, Fuster V, Badimon L, Badimon J, Taubman MB, Chesebro JH. Syndromes of accelerated atherosclerosis: role of vascular injury and smooth muscle cell proliferation.

J Am Coll Cardiol 1990; 15: 1667-1687

Jawien A, Bowen-Pope DF, Lindner V, Schwartz SM, Clowes AW. Platelet-derived growth factor promotes smooth muscle migration and intimal thickening in a rat model of balloon angioplasty.

J Clin Invest 1992; 89: 507-511

Jones M, Conkle DM, Ferrans VJ, Roberts WC, Levine FH, Melvin DB, Stinson EB. Lesions observed in arterial autogenous vein grafts. Light and electron microscopic evaluation.

Circulation 1973; 48: 198-210

Jonnesco T. Angine de poitrine guerie par la resection du sympathique cervicothoracique.

Bull Acad Med Paris 1920; 84: 93-102

Kageyama Y, Li XK, Suzuki S, Suzuki H, Suzuki K, Kazui T, Harada Y. Apoptosis in rat cardiac allograft rejection.

Transplant Proc 1998; 30: 2943-2943

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.

Br J Cancer 1972; 26: 239-257

Klebs E. Die Allgemeine Pathologie. Zweiter Theil. Störungen des Baues und der Zusammensetzung. Jena: Verlag Gustav Fischer, 1889

Kline J, Stearn H, Bloomer W, Leibow A. Application of a bronchial collateral circulation to the coronary arteries by cardiopneumopexy.

Am J Pathol 1956; 32: 663-693

Kloss A, Bohnke M. In vitro study of endothelial tolerance of 10 culture media with special reference to the pump and barrier function.

Fortschr Ophthalmol 1991; 88: 781-785

Kocher A. Ueber morbus Basedowi. Jena: Gustav Fischer 1 ed. 1901

Kockx MM, Cambier BA, Bortier HE, De Meyer GR, Declercq SC, van Cauwelaert PA, Bultinck J. Foam cell replication and smooth muscle cell apoptosis in human saphenous vein grafts.

Histopathology 1994; 25: 365-371

Kohler TR, Kirkman TR, Kraiss LW, Zierler BK, Clowes AW. Increased blood flow inhibits neointimal hyperplasia in endothelialized vascular grafts.

Circ Res 1991; 69: 1557-1565

Konerding MA, Knocks M, Zerkowski HR. Impact of the incubation medium on the endothelium of autologous vein grafts: damage scoring by scanning electron microscopy.

Scanning Microsc 1996; 10: 841-848

Kraiss LW, Clowes AW. Response of the arterial wall to injury and intimal hyperplasia. In Basic Science of Vascular Disease, Second Edition, Edited by Sidawy AN, Sumpio BE, Giordano JM, DePalma RG. Futura Publishing Company, Armonk, NY, 1997

Langer L, Die Foramina thebesu im Herzen des Menschen. Sitzungsbericht Akad Wiss Wien 1880; 82: 25-9

Leist M, Single B, Castoldi AF, Kuhnle S, Nicotera P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis.

J Exp Med 1997; 185: 1481-1486

Lemson MS, Tordoir JH, Daemen MJ, Kitslaar PJ. Intimal hyperplasia in vascular grafts. Eur J Vasc Endovasc Surg 2000; 19: 336-350

Lennon SV, Martin SJ, Cotter TG. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli.

Cell Prolif 1991; 24: 203-214

Lindgren I. Angina pectoris, a clinical study with special reference to neurosurgical treatment.

Acta Med Scand 1950; 1-141

Lindner V, Lappi DA, Baird A, Majack RA, Reidy MA. Role of basic fibroblast growth factor in vascular lesion formation.

Circ Res 1991; 68: 106-113

Lockshin RA, Williams CM. Programmed Cell Death - I. Cytology of degeneration in the intersegmental muscle of the pernyi silkmoth.

J Insect Physiol 1965; 11: 123-133

Maciag T, Kadish J, Wilkins L, Stemerman MB, Weinstein R. Organizational behavior of human umbilical vein endothelial cells.

J Cell Biol 1982; 94(3): 511-520

Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death.

Am J Pathol 1995; 146: 3-15

Mayr M, Li C, Zou Y, Huemer U, Hu Y, Xu Q. Biomechanical stress-induced apoptosis in vein grafts involves p38 mitogen-activated protein kinases.

FASEB J 2000; 14: 261-270

McCabe M, Cunningham GJ, Wyatt AP, Rothnie NG, Taylor GW. A histological and histochemical examination of autogenous vein grafts.

Br J Surg 1967; 54: 147-155

Meyer D, Baumgardt S, Loffeler S, Gassel HJ, Czub S, Ulrichs K et al. Apoptosis in combined liver/small bowel transplantation.

Transplant Proc 1998; 30: 2588

MORGAN,JF, MORTON HJ, PARKER RC. Nutrition of animal cells in tissue culture; initial studies on a synthetic medium.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 1950; 73: 1-8

Moritz A, Hudson C, Orgain E. Augmentation of the extracardiac anastomoses of the coronary arteries through pericardial adhesions.
J Exp Med 1932; 56: 927-931

Motwani JG, Topol EJ. Aortocoronary saphenous vein graft disease: pathogenesis, predisposition, and prevention.
Circulation 1998; 97: 916-931

Mueller RL, Rosengart TK, Isom OW. The history of surgery for ischemic heart disease.
Ann Thorac Surg 1997; 63: 869-878

Newby AC, George SJ. Proposed roles for growth factors in mediating smooth muscle proliferation in vascular pathologies.
Cardiovasc Res 1993; 27: 1173-1183

Nguyen HC, Grossi EA, LeBoutillier M, III, Steinberg BM, Rifkin DB, Baumann FG,Colvin SB, Galloway AC. Mammary artery versus saphenous vein grafts: assessment of basic fibroblast growth factor receptors.
Ann Thorac Surg 1994; 58: 308-310

Nicotera P, Leist M, Ferrando-May E. Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis.
Toxicol Lett 1998; 102-103: 139-142

O'Brien JE, Jr., Ormont ML, Shi Y, Wang D, Zalewski A, Mannion JD. Early injury to the media after saphenous vein grafting.
Ann Thorac Surg 1998; 65: 1273-1278

Padosch SA, Vogel P, Böttinger BW. Neuronal apoptosis following cerebral ischemia. Basis, phsiopathology and treatment strategies.
Anaesthesist 2001 50: 905-920

Parolari A, Sala R, Antona C, Bussolati O, Alamanni F, Mezzadri P, Dall'Asta V, Gazzola GC, Biglioli P. Hypertonicity induces injury to cultured human endothelium: attenuation by glutamine.
Ann Thorac Surg 1997; 64: 1770-1775

Penny WJ, Chesebro JH, Heras M, Fuster V. Antithrombotic therapy for patients with cardiac disease.
Curr Probl Cardiol 1988; 13: 433-513

Portera-Cailliau C, Price DL, Martin LJ. Excitotoxic neuronal death in the immature brain is an apoptosis-necrosis morphological continuum.
J Comp Neurol 1997; 378: 70-87

Pratt F. The nutrition of the heart through the vessels of thebesius and the coronary veins.
Am J Physiol 1898; 1: 86-89

- Ratliff NB, Myles JL. Rapidly progressive atherosclerosis in aortocoronary saphenous vein grafts. Possible immune-mediated disease.
Arch Pathol Lab Med 1989; 113: 772-776
- Rodriguez E, Lambert EH, Magno MG, Mannion JD. Contractile smooth muscle cell apoptosis early after saphenous vein grafting.
Ann Thorac Surg 2000; 70: 1145-1153
- Rossig L, Dimmeler S, Zeiher AM. Apoptosis in the vascular wall and atherosclerosis
Basic Res Cardiol 2001; 96: 11-22
- Sayers RD, Jones L, Varty K, Allen K, Morgan JD, Bell PR et al. The histopathology of infrainguinal vein graft stenoses.
Eur J Vasc Surg 1993; 7: 16-20
- Schaeffer U, Tanner B, Strohschneider T, Stadtmüller A, Hannekum A. Damage to arterial and venous endothelial cells in bypass grafts induced by several solutions used in bypass surgery.
Thorac Cardiovasc Surg 1997; 45: 168-171
- Sanchez AM, Wooldridge TA, Boerboom LE, Olinger GN, Almassi GH, Rusch NJ. Comparison of saphenous vein graft relaxation between Plasma-Lyte solution and normal saline solution.
J Thorac Cardiovasc Surg 1994; 107: 1445-1453
- Schiebler TH, Schmidt W, Zilles K. Anatomie. Berlin : 7 ed. Springer Verlag, 1997
- Schierle GS, Hansson O, Leist M, Nicotera P, Widner H, Brundin P. Caspase inhibition reduces apoptosis and increases survival of nigral transplants.
Nat Med 1999; 5: 97-100
- Schmaus H, Albrecht E. Über Karyorrhexis.
Virchows Arch Pathol Anat 1894, 138: 1-80
- Schwartz LB, O'Donohue MK, Purut CM, Mikat EM, Hagen PO, McCann RL. Myointimal thickening in experimental vein grafts is dependent on wall tension.
J Vasc Surg 1992; 15: 176-186
- Shafi S, Palinski W, Born GV. Comparison of uptake and degradation of low density lipoproteins by arteries and veins of rabbits.
Atherosclerosis 1987; 66: 131-138
- Shuhaiber JH, Evans AN, Massad MG, Geha AS. Mechanisms and future directions for prevention of vein graft failure in coronary bypass surgery.
Eur J Cardiothorac Surg 2002; 22: 387-396
- Solberg S, Larsen T, Jorgensen L, Sorlie D. Cold induced endothelial cell detachment in human saphenous vein grafts.
J Cardiovasc Surg 1987; 28: 571-575
- Statistisches Bundesamt: Sterbefälle (absolut, Sterbeziffer, Ränge, Anteile) für die 10/20/50/100 häufigsten Todesursachen (ab 1998).
www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd_init?gbe.isgbetol/xs_start_neu/357421387/92917084
(download 17.6.2008)

Svendsen E, Dalen H, Moland J, Engedal H. Crater formation and endocytosis in human endothelial cells in vitro.

Atherosclerosis 1985; 58: 27-37

Svendsen E, Dalen H, Moland J, Engedal H. A quantitative study of endothelial cell injury in aorto-coronary vein grafts.

J Cardiovasc Surg 1986; 27: 65-71

Thatte HS, Khuri SF. The coronary artery bypass conduit: I. Intraoperative endothelial injury and its implication on graft patency.

Ann Thorac Surg 2001; 72: 2245-2252

Trieb K, Eberl T, Steger M, Ofner D, Steinlechner R, Gnaiger E, Schrocksnadel H, Grubeck-Loebenstien B, Margreiter R. Apoptosis is involved in endothelial cell damage during preservation and influenced by organ storage solutions.

Transplant Proc 1997; 29: 416-418

van Brussel BL, Ernst JM, Ernst NM, Kelder HC, Knaepen PJ, Plokker HW, Vermeulen FE, Voors AA. Clinical outcome in venous coronary artery bypass grafting: a 15-year follow-up study.

Int J Cardiol 1997; 58: 119-126

Vanhoutte PM. Endothelium-dependent contractions in arteries and veins.

Blood Vessels 1987; 24: 141-144

Vashisht R, Sian M, Franks PJ, O'Malley MK. Long-term reduction of intimal hyperplasia by the selective alpha-1 adrenergic antagonist doxazosin.

Br J Surg 1992; 79: 1285-1288

Verrier ED, Boyle EM, Jr. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery.

Ann Thorac Surg 1996; 62: 915-922

Vineberg A. Surgery of coronary artery disease.

Prog Cardiovasc Dis 1962; 4: 391-418

Virchow R: Cellular Pathology as Based upon Physiological and Pathological Histology, ed 2. Translated from German by B. Chance, 1859 Reproduced by Dover Publications, New York: 1971 pp 356-382

Virmani R, Atkinson JB, Forman MB. Aortocoronary saphenous vein bypass grafts.

Cardiovasc Clin 1988; 18: 41-62

Wagner R. Intimal protection of bypass-veins during intraoperative storage in blood or Euro-Collins-solution: the role of medium, temperature, and time.

Thorac Cardiovasc Surg 1990; 38: 151-156

Wang AY, Bobryshev YV, Liang H, Cherian SM, Inder SJ, Ashwell KW, Farnsworth AE, Lord RS. Electron-microscopic detection of apoptotic and necrotic cell death in non-atherosclerotic areas of stenotic aortocoronary saphenous vein bypass grafts.

J Submicrosc Cytol Pathol 2000; 32: 209-219

Wang AY, Bobryshev YV, Cherian SM, Liang H, Tran D, Inder SJ, Lord RS, Ashwell KW, Farnsworth AE. Expression of apoptosis-related proteins and structural features of cell death in explanted aortocoronary saphenous vein bypass grafts.

Cardiovasc Surg 2001; 9: 319-328

Weigert C. Über die pathologischen Gerinnungsvorgänge.

Virchows Arch Pathol Anat 1880, 79: 87-123

Welz A. Cytotoxicity of Various Cristalloid Solutions to the Endothelial Cells of Autologous Grafts.

Thorac Cardiovasc Surg 1991; 39: 236-240

Wesly RL, Vaishnav RN, Fuchs JC, Patel DJ, Greenfield JC, Jr. Static linear and nonlinear elastic properties of normal and arterialized venous tissue in dog and man.

Circ Res 1975; 37: 509-520

Zilla P, von Oppell U, Deutsch M. The endothelium: a key to the future.

J Card Surg 1993; 8: 32-60

Zerkowski HR, Knocks M, Konerding MA, Doetsch N, Roth G, Hakim K, Reidemeister JC. Endothelial damage of the venous graft in CABG. Influence of solutions used for storage and rinsing on endothelial function.

Eur J Cardiothorac Surg 1993; 7: 376-382

8. Danksagung

Ich möchte allen, die mich bei der Vollendung meiner Dissertation unterstützt haben, meinen Dank aussprechen. Insbesondere gilt mein Dank:

Prof. Dr. med. Claus Jürgen Preuße für die Unterstützung und Ratschläge.

Prof. Dr. med. Armin Welz für die Möglichkeit, dieses Forschungsprojekt an seiner Klinik durchführen zu können.

Dr. Claus Nill und Dr. Kai Winkler für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie die fachliche Unterstützung und anregende Diskussion.

Frau Christine Peigney aus dem Chirurgischen Labor der Uniklinik Bonn für die tatkräftige Unterstützung. Ohne ihre Hilfe wäre diese Arbeit kaum möglich gewesen.

Frau Claudia Nicolay vom Statistischen Institut der Uniklinik Bonn für ihre freundliche Beratung.

Dem Pathologischen Institut der Uniklinik Bonn.

Schließlich möchte ich mich ganz besonders bei meinen Eltern, meinen Geschwistern und nicht zuletzt bei meiner lieben Ehefrau bedanken. Durch ihre Liebe, ihr Vertrauen und ihre Unterstützung, hat Sie mir die Kraft zur Vollendung dieser Arbeit gegeben.